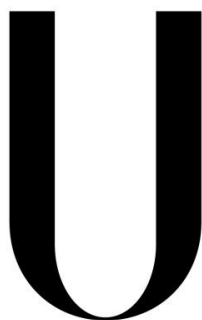


UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina de Lisboa



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

***Patogénese da doença do fígado gordo
não-alcoólico em murganhos:
O papel das células de Kupffer***

Joana Inês Santos de Almeida

Orientador(es): Prof. Doutor Carlos Penha Gonçalves
Prof. Doutor Manuel Bicho

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de
Mestre em Doenças Metabólicas e Comportamento Alimentar

2016

A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 16 de Fevereiro de 2016.

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina de Lisboa



***Patogénese da doença do fígado gordo
não-alcoólico em murganhos:
O papel das células de Kupffer***

Joana Inês Santos de Almeida

Orientador(es): Prof. Doutor Carlos Penha Gonçalves
Prof. Doutor Manuel Bicho

Dissertação especialmente elaborada para obtenção do grau de Mestre em
Mestrado em Doenças Metabólicas e Comportamento Alimentar

Instituto Gulbenkian de Ciência

2016

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que tornam possível a elaboração desta tese.

- ❖ Em primeiro lugar, o meu agradecimento especial é dirigido ao meu orientador científico, Professor Doutor Carlos Penha Gonçalves, pela sua orientação e pela revisão desta dissertação, salientando a sua elevada objectividade e competência científica. Gostaria ainda de agradecer pelo seu enorme acolhimento no seu laboratório, *Disease Genetics* do Instituto Gulbenkian de Ciência, desde o final da minha licenciatura e por todos os conselhos e críticas que me foi dando durante estes quase três anos, que muito me ajudaram a evoluir tanto profissional como pessoalmente.
- ❖ Em segundo lugar, o meu enorme agradecimento é dirigido ao meu co-orientador, Professor Doutor Manuel Bicho da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa, pela sua disponibilidade, interesse e discussões de elevado valor científico.
- ❖ De seguida, gostaria de agradecer à Professora Maria Paula Macedo do CEDOC (*NOVA Medical School* da Faculdade de Ciências Médicas/Universidade Nova de Lisboa), pela possibilidade que me foi concedida em integrar o seu projecto de investigação e de colaborar no seu artigo de revisão. Agradeço ainda a oportunidade de ter participado na Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Diabetologia e no 11º Congresso Português da Diabetes.
- ❖ Agradeço profundamente à *postdoc* Nádia Duarte pelos seus ensinamentos e supervisão diária. Obrigada pela sua disponibilidade, acolhimento, paciência (muita) e por todas as conversas e desabafos durante estes três anos de convivência.
- ❖ Os meus agradecimentos são também dirigidos a todos os colegas e amigos do grupo *Disease Genetics* do Instituto Gulbenkian de Ciência, em especial à Inês Coelho e ao Denys Holovanchuk, pela colaboração neste projecto, pela amizade e partilha de experiências e histórias.
- ❖ Não poderia deixar de agradecer a toda a Unidade de Imagem e Citometria do Instituto Gulbenkian de Ciência, especialmente à Ânia Gonçalves, pela sua

disponibilidade e simpatia, pelo interesse neste projecto e pela partilha do seu conhecimento “microscópico”.

- ❖ Um enorme agradecimento à Joana Rodrigues e Marta Pinto, da Unidade de Histopatologia do Instituto Gulbenkian de Ciência, pelas competências técnicas e por todo o interesse que sempre demonstraram por este projecto.
- ❖ Gostaria de agradecer também à patologista Tânia Carvalho do Instituto de Medicina Molecular, pela sua ajuda com a avaliação histopatológica dos fígados dos animais, pelas discussões e *in-puts* científicos de grande valor.
- ❖ Quero salientar também a ajuda preciosa do meu arquitecto preferido, André Oliveira, na elaboração de um esquema presente nesta tese.
- ❖ Muito obrigada à minha família e amigos, em particular aos meus avós, pela paciência e todos os mimos durante esta fase.
- ❖ A ti Luís, muito obrigada por todo o teu amor e compreensão. Obrigada pela tua paciência infinita comigo, pela motivação diária e por me teres ajudado a superar os momentos mais críticos. Obrigada por teres estado sempre presente e por me fazeres tão feliz.
- ❖ Por último, o meu maior agradecimento é dirigido às três pessoas mais importantes da minha vida: o meu pai, a minha mãe e o meu irmão.
Uma palavra de reconhecimento muito especial a vocês pelo vosso amor incondicional. Muito obrigada pelo vosso apoio, confiança e motivação diárias. Muito obrigada pela valorização sempre tão entusiasta do meu trabalho e pela forma como ao longo de todos estes anos me ajudaram sempre na realização dos meus sonhos.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

“In the final analysis, the questions of why bad things happen to good people transmutes itself into some very different questions, no longer asking why something happened, but asking how we will respond, what we intend to do now that it happened.”

Pierre Teilhard de Chardi

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	V
---------------------	---

ÍNDICE	IX
--------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
----------------------------	------

RESUMO.....	XVII
-------------	------

ABSTRACT.....	XIX
---------------	-----

PALAVRAS-CHAVE	XXI
----------------------	-----

I. INTRODUÇÃO	- 1 -
---------------------	-------

1. A doença do fígado gordo não-alcoólico (NAFLD).....	- 3 -
--	-------

2. Caracterização e história natural da NAFLD	- 3 -
---	-------

3. Epidemiologia da NAFLD	- 5 -
---------------------------------	-------

4. Sintomatologia, diagnóstico e terapêutica da NAFLD	- 7 -
---	-------

5. Modelos animais para o estudo da NAFLD	- 8 -
---	-------

5.1. Modelos genéticos.....	- 9 -
-----------------------------	-------

5.1.1. Murganhos <i>ob/ob</i> , murganhos <i>db/db</i> e ratos Zucker (<i>fa/fa</i>).....	- 9 -
---	-------

5.1.2. Murganhos <i>KK-A^y</i> e murganhos <i>knockout</i> para o receptor 4 da melanocortina-	10
--	----

-

5.1.3. Murganhos transgênicos para a proteína 1 c de ligação ao elemento regulador dos esteróides (SREBP-1c)	- 11 -
--	--------

5.2. Modelos induzidos por dietas.....	- 11 -
--	--------

5.2.1. Dietas hiperlipídicas	- 11 -
------------------------------------	--------

5.2.2. Dietas ricas em frutose.....	- 13 -
-------------------------------------	--------

5.2.3. Dieta tipo <i>western</i> e dieta tipo <i>fast-food</i>	- 14 -
--	--------

5.2.4. Dieta deficiente em metionina e colina.....	- 14 -
--	--------

5.3. Modelos combinados	- 15 -
-------------------------------	--------

6. Patogénese da NAFLD.....	- 15 -
-----------------------------	--------

6.1. Inflamação hepática	- 16 -
--------------------------------	--------

7. As células de Kupffer.....	- 16 -
7.1. As células de Kupffer e a NAFLD.....	- 17 -
7.2. As células de Kupffer na patogénese da NAFLD.....	- 18 -
7.3. As células de Kupffer e o processo fibrótico da NAFLD	- 22 -
7.4. As células de Kupffer e as adipocinas no contexto da NAFLD	- 23 -
8. O Cluster de diferenciação 26 (CD26)	- 24 -
II. OBJECTIVOS	- 27 -
III.MATERIAIS E MÉTODOS	- 31 -
1. Materiais.....	- 33 -
1.1. Animais	- 33 -
1.2. Reagentes	- 34 -
2. MÉTODOS	- 35 -
2.1. Estudos <i>in vivo</i>	- 35 -
2.1.1. Desenho do estudo	- 35 -
2.1.2. Prova de tolerância à glicose oral	- 36 -
2.1.3. Quantificação de triglicéridios no plasma.....	- 36 -
2.1.4. Avaliação histo-patológica do tecido hepático	- 37 -
2.1.5. Análise histológica das células de Kupffer.....	- 37 -
2.1.5.1. Imuno-histoquímica	- 37 -
2.1.5.2. Quantificação estereológica das células de Kupffer	- 38 -
2.1.6. Isolamento das células não-parenquimatosas	- 39 -
2.1.7. Quantificação da expressão génica por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) - 40 -	
2.1.7.1. Extracção do RNA de tecido hepático e de células não-parenquimatosas - 40 -	
2.1.7.2. Transcrição reversa (Síntese de cDNA)	- 41 -
2.1.7.3. PCR quantitativo em tempo real	- 41 -
2.2. Estudos <i>in vitro</i>	- 42 -
2.2.1. Desenho do estudo	- 42 -
2.2.2. Quantificação da actividade enzimática do CD26.....	- 42 -
2.2.3. Quantificação da concentração proteica de:	- 43 -
2.2.3.1. Factor de necrose tumoral- α (TNF- α)	- 43 -
2.2.3.2. Interleucina-10 (IL-10)	- 44 -
2.3. Análise estatística.....	- 44 -
IV. RESULTADOS	- 45 -

1. Caracterização de modelos murinos da NAFLD induzidos por dietas hipercalóricas-	47
-	
1.1. Ingestão de dieta	47 -
1.2. Ganho de peso e efeitos sistémicos	48 -
1.3. Patologia hepática	48 -
1.4. Expressão genética	50 -
1.4.1. Genes lipogénicos	51 -
1.4.2. Genes pró-inflamatórios	52 -
1.4.3. Genes pró-fibróticos	54 -
1.5. Quantificação estereológica das células de <i>Kupffer</i>	56 -
2. Contribuição da molécula CD26 na imunopatogénese da NAFLD	57 -
2.1. Expressão genética do CD26.....	57 -
2.2. Ingestão de dieta	58 -
2.3. Ganho de peso e efeitos sistémicos	58 -
2.4. Patologia hepática	59 -
2.5. Expressão genética	60 -
2.5.1. Genes lipogénicos	60 -
2.5.2. Genes pró-inflamatórios	61 -
2.5.3. Genes pró-fibróticos	63 -
3. O papel do CD26 na activação das células de <i>Kupffer</i>	65 -
3.1. Actividade enzimática do CD26	65 -
3.2. Produção de mediadores inflamatórios.....	66 -
3.2.1. Factor de necrose tumoral- α (TNF- α)	66 -
3.2.2. Interleucina-10 (IL-10)	67 -
V. DISCUSSÃO.....	71 -
1. Caracterização de modelos da NAFLD induzidos por dietas hipercalóricas	73 -
2. Contribuição da molécula CD26 na imunopatogénese da NAFLD	79 -
3. O papel do CD26 na activação das células de <i>Kupffer</i>	81 -
VI. CONCLUSÃO	83 -
VII. BIBLIOGRAFIA	87 -
VIII. ANEXOS.....	105 -

ANEXO 1.....	- 107 -
ANEXO 2.....	- 111 -
ANEXO 3.....	- 115 -

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC1	Acetil-CoA carboxilase 1
Acetil-CoA	Acetil coenzima A
ADA	Adenosina deaminase
ARG1	Arginase 1
AST/ALT	Rácio aspartato aminotransferase/alanina aminotransferase
AP	Ácido Palmítico
AP-1	Proteína activadora 1 (<i>Activator protein-1</i>)
4-AP4	4-Aminofenazona
CD14	Cluster de diferenciação 14 (<i>Cluster of differentiation 14</i>)
CD26	Cluster de diferenciação 26 (<i>Cluster of differentiation 26</i>)
CD36	Cluster de diferenciação 36 (<i>Cluster of differentiation 36</i>)
ChREBP	Proteína de ligação ao elemento responsivo aos carboidratos (<i>Carbohydrate-Responsive Element-Binding Protein</i>)
CO	Campo óptico
CV	Veia centrolobular (<i>Centrolobular vein</i>)
DAB	3,3'-Diaminobenzidina
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano (<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>)
DC	Células dendríticas (<i>Dendritic cells</i>)
DGAT2	Diacylglicerol-acil-transferase 2 (<i>Diacylglycerol O-acyltransferase 2</i>)
DHAP	Fosfato de di-hidroxiacetona (<i>Dihydroxyacetone phosphate</i>)
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>)
DPP-IV	Dipeptidil peptidase IV
EMR1	<i>EGF module-containing mucin-like hormone receptor 1</i>
epm	Erro padrão médio
ERK	Cinase regulada por sinais extracelulares (<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>)
FAS	Sintase dos ácidos gordos (<i>Fatty acid synthase</i>)
FN1	Fibronectina 1 (<i>Fibronectin 1</i>)
GIP	Peptídeo insulínico glicose dependente (<i>Glucose-dependent insulinotropic peptide</i>)
GK	Cinase do Glicerol (<i>Glycerol Kinase</i>)
GLP-1	Péptido 1 semelhante ao glucagon (<i>Glucagon-Like Peptide-1</i>)
GLP-2	Péptido 2 semelhante ao glucagon (<i>Glucagon-Like Peptide-2</i>)

GPO	Glicerol-3-fosfato oxidase (<i>Glycerol-3-Phosphate Oxidase</i>)
G3P	Glicerol-3-fosfato (<i>Glycerol-3-Phosphate</i>)
HC	Hidratos de carbono
HFE	Proteína da Hemocromatose (<i>Human Hemochromatosis Protein</i>)
HMGB1	Proteína do grupo 1 de elevada mobilidade (<i>High Mobility Group Box 1</i>)
HSC	Células hepáticas estreladas (<i>Hepatic Stellate Cells</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
ICAM-1	Molécula 1 de adesão celular (<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>)
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IKK	Complexo I κ B quinase (<i>I kappa B kinase</i>)
IL-1	Interleucina-1
IL-1 β	Interleucina-1beta
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-23	Interleucina-23
IMC	Índice de massa corporal
iNOS	Isoforma indutível da sintase do óxido nítrico (<i>inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
IRAK-1	Cinase 1 associada ao receptor da IL-1 (<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>)
IRAK-4	Cinase 4 associada ao receptor da IL-1 (<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 4</i>)
IRF3	Factor 3 de regulação do interferon (<i>Interferon regulatory factor 3</i>)
IRF7	Factor 7 de regulação do interferon (<i>Interferon regulatory factor 7</i>)
JNK	Cinase do N-terminal de Jun (<i>Janus N-terminal kinase</i>)
KC	Células de Kupffer (<i>Kupffer Cells</i>)
KO	<i>Knockout</i>
LBP	Proteína ligante do LPS (<i>Lipopolysaccharide Binding Protein</i>)
LDN	Lipogénese de novo
LPL	Lipoproteína lipase
LPS	Lipopolissacarídeo
MacPercav	Macrófagos da cavidade peritoneal
MAPK	Proteína cinase activada por mitógenos (<i>Mitogen-activated protein kinase</i>)

MCD	Deficiente em metionina e colina (<i>Methionine and Choline Deficient</i>)
MCP-1	Proteína 1 quimioatraente de monócito (<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MC4R	Receptor 4 da melanocortina (<i>Melanocortin 4 receptor</i>)
MD2	Proteína mielóide diferenciadora 2 (<i>Myeloid Differentiation factor 2</i>)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MIP-1 α	Proteínas inflamatórias de macrófagos-1 α (<i>Macrophage Inflammatory Proteins-1α</i>)
MMPs	Metaloproteinases da matriz (<i>Matrix MetalloProteinases</i>)
mRNA	RNA mensageiro
MyD88	Factor de diferenciação mielóide 88 (<i>Myeloid Differentiation primary response protein 88</i>)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reduzido) (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NAFLD	Doença do fígado gordo não-alcoólico (<i>Non-Alcoholic Fatty Liver Disease</i>)
NASH	Esteato-hepatite não-alcoólica (<i>Non-Alcoholic SteatoHepatitis</i>)
NF- κ B	Factor nuclear κ B (<i>Nuclear Factor kappa B</i>)
NK	<i>Natural Killer</i>
NPC	Células não-parenquimatosas (<i>Non-Parenchymal Cells</i>)
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i>)
PCR	Reacção de polimerização em cadeia (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDGF	Factor de crescimento derivado de plaquetas (<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>)
POD	Peroxidase
PPAR- α	Receptor- α activado por proliferadores de peroxissomas (<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α</i>)
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões (<i>Pattern Recognition Receptors</i>)
PT	Triada portal (<i>Portal triad</i>)
PTGO	Prova de tolerância à glicose oral
p38/MAPK	Proteína p38/Cinase activadas por mitogénios (<i>Mitogen-activated protein kinases</i>)
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real (<i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i>)

RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécies reactivas de oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RT-PCR	Transcrição reversa – Reacção de polimerização em cadeia (<i>Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction</i>)
SCD1	Esterol-CoA desaturase (<i>Stearoyl-CoA desaturase-1</i>)
SPF	Livres de patógenos específicos (<i>Specific-Pathogen-Free</i>)
SREBPs	Proteínas de ligação ao elemento regulador de esteróis (<i>Sterol Regulatory Element-Binding Proteins</i>)
SREBP-1c	Proteína 1 c de ligação ao elemento regulador de esteróis (<i>Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1 c</i>)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAK-1	Cinase activada pelo TGF(- β) (<i>Transforming growth factor-β-activated kinase 1</i>)
TAB-1	Proteína 1 de ligação à TAK-1 (<i>TAK-1-binding protein1</i>)
TAB-2/3	Proteínas 2 e 3 de ligação à TAK-1 (<i>TAK-1-binding protein 2/3</i>)
TBK-1	Cinase de ligação à TANK-1. (<i>TANK-binding kinase 1</i>)
TG	Triglicerídios/Triacilgliceróis
TGF(- β)	Factor de crescimento transformante β (<i>Transforming Growth Factor-β</i>)
TIR	Receptor <i>toll</i> -interleucina-1 (<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>)
TIRAP/MAL	Proteína adaptadora contendo o domínio TIR (<i>TIR domain containing adaptor protein/ MyD88 Adapter-Like</i>)
TLR4	Receptor 4 do tipo “Toll” (<i>Toll-like receptor 4</i>)
TIMPs	Inibidores de metaloproteínases específicas do tecido (<i>Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases</i>)
TNF- α	Factor de necrose tumoral α (<i>Tumor necrosis factor α</i>)
TRAF-6	Factor 6 associado ao receptor do TNF (<i>TNF Receptor-Associated Factor 6</i>)
TRIF	Proteína adaptadora contendo o domínio TIR indutora de IFN- β (<i>TIR-domain-containing adaptor inducing IFN-beta</i>)
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TIRF (<i>TRIF-related adaptor molecule</i>)
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>)
WT	<i>Wild-type</i>
12%G30%F	Glicose (12% m/v) + Frutose (30% m/v)

RESUMO

Com os mais recentes avanços na prevenção e cura da hepatite C, a doença do fígado gordo não-alcoólico (NAFLD) afigura-se como a maior causa de morbilidade e mortalidade associada a doenças hepáticas. Estima-se que a NAFLD afecte um bilião de indivíduos em todo o mundo e cerca de 15% da população portuguesa. A sua prevalência acompanha de perto a da síndrome metabólica, reflectindo o impacto dos estilos de vida nas sociedades contemporâneas. A NAFLD desenvolve-se sobre um quadro inflamatório crónico, que envolve os macrófagos do próprio tecido hepático (i.e. as células de *Kupffer* (KC)), mas cujos mecanismos patogénicos ainda não foram totalmente clarificados.

Esta tese caracteriza os efeitos de duas combinações hipercalóricas (dieta tipo *Western* ou suplementação de glicose (12%*m/v*) e frutose (30%*m/v*) (12%G30%F) na água de bebida) na desregulação do metabolismo sistémico e na indução da patologia típica da NAFLD em modelos murinos.

Observou-se que no fim do tempo de exposição aos dois regimes hipercalóricos, os murganhos apresentaram evidências histológicas de esteatose hepática, tiveram um aumento de peso corporal mas as perturbações sistémicas do metabolismo estavam ainda ausentes, o que permitiu avaliar alguns dos mecanismos patogénicos iniciais promotores da NAFLD. A análise da expressão genética ao tecido hepático mostrou que a exposição à dieta tipo *Western* teve uma acção lipogénica enquanto que a combinação de 12%G30%F na água de bebida induziu a expressão de genes pró-inflamatórios e pró-fibróticos em células não-parenquimatosas (NPC), nomeadamente o aumento da expressão genética do *cluster* de diferenciação 26 (CD26). Adicionalmente, observou-se que a depleção genética do *Cd26* protegeu os murganhos das respostas pró-inflamatórias e pró-fibróticas responsáveis pela NAFLD após exposição ao regime 12%G30%F. Por último, ensaios *in vitro* demonstraram que a actividade de dipeptidil peptidase IV do CD26, face a diferentes estímulos inflamatórios, estava aumentada em culturas de KC comparativamente a macrófagos convencionais e que a ausência do CD26 inibiu a activação das KC atenuando a produção dos mediadores inflamatórios (TNF- α e IL-10). Este trabalho permite concluir que no contexto de dietas suplementadas com hidratos de carbono (principalmente frutose) as KC são activadas e medeiam respostas inflamatórias nas fases iniciais da patogénese da NAFLD e que a ausência do CD26 inibe a activação destas células protegendo os murganhos desta patologia. Este conjunto de resultados sugere que inibidores farmacológicos do CD26 direccionados para as KC poderão constituir, no futuro, uma opção terapêutica para a prevenção da NAFLD.

ABSTRACT

With recent advances in the prevention and treatment of hepatitis C, NAFLD is poised to become the leading cause of morbidity and mortality associated with liver diseases. It is estimated that NAFLD affects one billion of individuals worldwide and 15% of the portuguese population. Its prevalence follows the metabolic syndrome, reflecting the impact of lifestyles in contemporary societies. NAFLD develops over a chronic inflammatory process involving resident macrophages (*Kupffer* cells, KC), but whose pathogenic mechanisms have not been fully clarified.

The present study addressed the effects of two hypercaloric combinations (Western diet and supplementation of glucose (12%*m/v*) and fructose (30%*m/v*) (12%G30%F) in drinking water) in systemic dysmetabolism and induction of NAFLD pathology in mouse models.

It was observed that, at the end of hypercaloric treatment, mice showed histologic evidence of fatty liver and had an increase in body weight, but were absent of systemic metabolic disorders, which allowed us to evaluate some of the early pathogenic mechanisms that impinges on NAFLD. Gene expression analysis of liver tissue showed that exposure to Western diet had a lipogenic action while the combination of 12%G30%F in drinking water induced the expression of proinflammatory and profibrotic genes in non-parenchymal cells, namely the increase of *Cd26* gene expression. Additionally, it was that observed mice lacking CD26 were protected from proinflammatory and profibrotic responses that promote NAFLD after exposure to 12%G30%F diet.

Finally, *in vitro* studies showed that KC primary cultures show greater CD26 enzymatic activity (dipeptidyl peptidase IV), regarding to different inflammatory stimuli, compared to conventional macrophages, and that the absence of CD26 inhibits KC activation reducing the production of inflammatory mediators (TNF- α and IL-10).

This study concluded that under carbohydrates enriched diets (particularly fructose), KC are activated and mediate inflammatory responses in the early stages of NAFLD pathogenesis and the absence of CD26 inhibits activation of these cells protecting mice from NAFLD.

These set of results suggest that pharmacological inhibitors of CD26 targeted to KC could be a possible therapeutic target for preventing NAFLD.

PALAVRAS-CHAVE

Doença do fígado gordo não-alcoólico

Células de *Kupffer*

Cluster de diferenciação 26

KEY-WORDS

Non-Alcoholic Fatty Liver Disease

Kupffer cells

Cluster of differentiation 26

I. INTRODUÇÃO

1. A doença do fígado gordo não-alcoólico (NAFLD)

Ao longo da história natural das populações humanas, os rigorosos períodos de escassez alimentar fizeram da capacidade de armazenamento de energia e da resistência periférica à insulina, duas vantagens evolutivas para a espécie (1). Speakman e colaboradores descreveram a existência de “*genes económicos*” (do inglês *thrifty genes*) como promotores de um eficiente armazenamento de energia ao nível do fígado (glicogénio e triglicerídios (TG)) e do tecido adiposo (TG) (2). Deste modo, os indivíduos portadores de genótipos de eficiência energética foram naturalmente seleccionados ao longo do tempo. Mas, se em tempos estas características permitiram a sobrevivência e reprodução diferencial da espécie humana, nas sociedades contemporâneas que proporcionam e promovem elevados consumos calóricos e práticas sedentárias, esta herança genética potencia o aparecimento de disfunções metabólicas como é o caso da doença do fígado gordo não-alcoólico (NAFLD).

2. Caracterização e história natural da NAFLD

Até à década de 80 acreditou-se que a patologia do fígado gordo com sinais de inflamação tinha origem no consumo excessivo de álcool. Foi nesta data que Ludwig *et al.*, descreveram pela primeira vez o termo “esteato-hepatite não-alcoólica” (NASH) e o utilizaram para caracterizar a condição do fígado gordo, numa *cohort* de mulheres obesas e diabéticas que negavam o consumo de álcool, mas que apresentavam alterações histológicas muito semelhantes à da hepatite alcoólica (3). A partir de então outras designações se seguiram como: doença do fígado pseudo-alcoólica, hepatite diabética, doença de *Laennec's* não-alcoólica ou esteatonecrose (4). Mas, só em 1986 se chegou a um consenso, passando a utilizar-se o termo “NAFLD” (5), para descrever um conjunto de condições hepáticas clínica e histologicamente diferentes entre si (*figura 1*), mas diagnosticadas em indivíduos sem consumo de álcool, isentos de infecção viral e outros marcadores de auto-imunidade ou doença congénita (6).

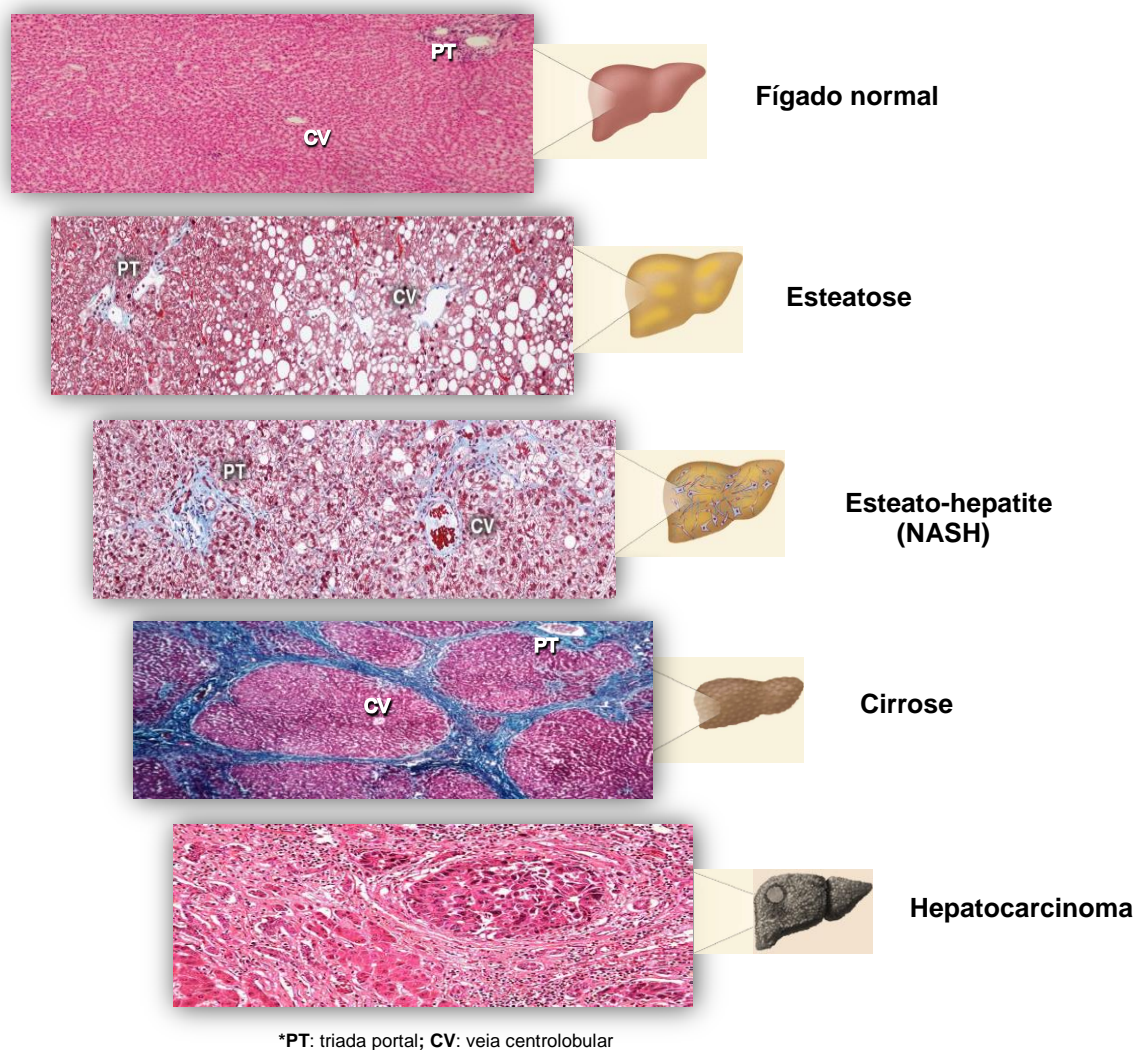


Figura 1. História natural de evolução da NAFLD (adaptado de (7)).

O espectro da NAFLD inicia-se com a esteatose hepática ou fígado gordo, caracterizado pela acumulação ectópica de TG, sob a forma de “gotículas lipídicas” (*lipid droplets*), em pelo menos 5% dos hepatócitos ou quando esta deposição abrange cerca de 95% da superfície hepática total (i.e., > 55 mg de TG por gramas de fígado) (8). Histologicamente é possível distinguir dois padrões de esteatose: (i) o microvesicular, caracterizado pela existência de múltiplas “gotículas lipídicas”, que se dispersam pelo citoplasma dos hepatócitos, não interferindo com a localização central do núcleo celular e (ii) o macrovesicular, no qual a existência de um único vacúolo lipídico bem desenvolvido empurra o núcleo dos hepatócitos para a periferia do seu citoplasma. Estudos indicam que a esteatose hepática da NAFLD é, na maioria dos casos, macrovesicular distribuindo-se, preferencialmente, pela região centrolobular. Contudo, em determinadas circunstâncias, este estágio pode apresentar um padrão microvesicular e distribuir-se uniformemente pelo parênquima (9).

O facto de a esteatose ser, na maioria dos casos, uma condição reversível constitui um bom prognóstico. Contudo se esta condição for negligenciada cerca de 12 a 40% dos indivíduos com esta patologia poderão desenvolver esteato-hepatite (NASH) num prazo de 8 a 13 anos (10). A NASH é caracterizada por esteatose macrovesicular, inflamação intralobular (i.e. infiltração de células mononucleares), balonização hepatocelular (i.e. degeneração hidrópica dos hepatócitos), corpos de Mallory, sendo quase sempre acompanhada por fibrose de diferentes graus (7,11). Estudos epidemiológicos descrevem que cerca de 25% dos indivíduos com NASH desenvolvem fibrose em 4 anos, estimando-se que em 6 anos esta taxa seja de 50% (12). A fibrose, inicialmente perisinusoidal e/ou periportal, pode evoluir para um padrão do tipo *bridging* e, em última instância, originar cirrose. De facto, em 14 anos, cerca de 13% e 25% dos pacientes com fibrose de grau 2 e 3, respectivamente, desenvolverão cirrose hepática (13). Esta condição, caracterizada pela perda da arquitectura hepática, formação de nódulos e alterações na vascularização hepática (7,14), é responsável por cerca de 4 a 27% dos casos de hepatocarcinoma sendo que 50% destes necessitarão de transplante hepático (7,10,15) ou cerca de 2,4 a 12,8% dos casos acabarão por morrer entre 3 a 12 anos (16).

Apesar de, na maioria dos casos, os estadios de progressão da NAFLD serem sucessivos, algumas destas condições podem desenvolver-se na ausência das anteriores. Por exemplo, estudos recentes reportam que alguns dos diagnósticos de cancro hepático correspondem a indivíduos com esteatose hepática mas sem indícios de NASH ou fibrose (17–19), o que dificulta a avaliação do prognóstico da NAFLD.

3. Epidemiologia da NAFLD

Actualmente, a NAFLD é considerada a epidemia hepática do século XXI (20) afectando cerca de um bilião de indivíduos em todo o mundo (21). Na Europa e nos Estados Unidos da América, estima-se que cerca de um terço dos indivíduos manifestem alguma condição do espectro da NAFLD (22–24), sendo que a população asiática começa a apresentar valores epidemiológicos semelhantes (25,26). Já em África, os poucos resultados epidemiológicos conhecidos sugerem uma taxa de prevalência inferior, tendo sido sugerido que a NAFLD está presente em apenas 10% dos indivíduos na população nigeriana (27).

A etiologia da NAFLD é multifactorial estando frequentemente associada à síndrome metabólica, definida pela Federação Internacional de Diabetes, como o conjunto de disfunções metabólicas que incluem a obesidade, a resistência à insulina/diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), a dislipidémia e a hipertensão arterial (28). De facto, cerca de um terço dos indivíduos com a NAFLD têm a síndrome metabólica e cerca de 80%

apresenta pelo menos um dos critérios desta síndrome (22,29). A obesidade constitui um dos factores de risco mais importantes no desenvolvimento e progressão desta patologia. Estudos recentes sugerem que, aproximadamente, 70% dos indivíduos com excesso de peso e 90% dos obesos apresentam esteatose hepática comparativamente aos indivíduos com peso normal (apenas 25%) (30). Mais ainda, a obesidade mórbida faz elevar esta estatística, já que quase a totalidade destes doentes apresentam fígado gordo e mais de um terço têm NASH (31). Mais alarmante parece ser a incidência desta doença na população pediátrica. De facto, independentemente dos critérios de diagnóstico, estima-se que 3% das crianças com peso normal e cerca de 36 a 53% das obesas apresentem a NAFLD (10).

A patogenia da NAFLD e da DM2 estão também intimamente ligadas, podendo cada uma influenciar o desenvolvimento da outra. Neste sentido, sabe-se que a DM2 é 5 a 9 vezes mais frequente em pacientes com a NAFLD do que em indivíduos saudáveis (32) e que cerca de 42,6 a 69,5% dos indivíduos diabéticos apresentam a NAFLD (33), sendo que a DM2 está ainda relacionada com o grau de severidade desta patologia hepática (32). Para além disso, estudos longitudinais indicam que a população de mulheres com historial clínico de diabetes gestacional tem uma elevada prevalência da NAFLD e possuem maior risco de vir a desenvolver DM2 (34).

A população geriátrica representa outro grupo com elevado risco para desenvolver a NAFLD que surge frequentemente associada à existência de outras comorbidades como a disglícemia, dislipidemia e acumulação de gordura visceral (35). Um estudo efectuado em 1977 revelou os resultados obtidos por análise de biópsias: na população geral, menos de 1% dos casos da NAFLD tinham idades inferiores ou iguais a 20 anos; 18% idades entre os 20 e 40 anos, e cerca de 39% idades iguais ou superiores a 60 anos (36), representando um grave problema de saúde pública para os países com população envelhecida. Para além da idade, Browning *et al.*, concluíram que até aos 60 anos, o género masculino é mais susceptível, e que a partir desta idade, a NAFLD é mais prevalente nas mulheres (22). Para além disso, a etnia parece constituir um factor protector ou de risco para a NAFLD. De acordo com diferentes autores, esta doença é mais frequente em indianos, seguidos pelos hispânicos, asiáticos, caucasianos, sendo menos frequente nos afro-americanos (21,22,37,38). As razões pelas quais a idade, o género e a etnia influenciam o desenvolvimento e/ou progressão do espectro da NAFLD, não estão ainda clarificadas.

4. Sintomatologia, diagnóstico e terapêutica da NAFLD

A NAFLD pode permanecer assintomática durante vários anos, correspondente às fases iniciais da doença. Contudo, sinais de fadiga, perda de apetite e peso, fraqueza, náuseas, perda da capacidade de concentração, dor na região abdominal direita são alguns dos sintomas que podem surgir com o evoluir da doença (39).

O facto de a maioria dos pacientes com a NAFLD se manter assintomático aliado ao facto da biópsia hepática ser o método *gold standard* para a identificação dos estadios desta doença (6,10,20), faz com que o seu diagnóstico nem sempre seja precoce. Para além de bastante invasivo (apresenta uma taxa de 0,3% e 0,01% de complicações clínicas e mortalidade, respectivamente (40)), este método acarreta elevados custos financeiros e alguns erros de amostragem (apresenta uma taxa de discordância quanto à presença de esteatose hepática de 18% e com apenas uma biópsia cerca de 24% destes pacientes não são identificados (40)). Deste modo, o recurso a este método de diagnóstico só é justificável caso os níveis plasmáticos de ferritina (associados a hemocromatose) estejam elevados, e caso sejam detectados anticorpos indicadores de hepatite auto-imune ou esteja descrita a ingestão de determinados fármacos (10). Caso contrário, devem ser utilizados métodos de diagnóstico não-invasivos, entre os quais: (i) análises de alguns marcadores bioquímicos (como as concentrações séricas de albumina, globulinas, colesterol, bilirrubina, fosfatase alcalina; rácio aspartato aminotransferase/alanina aminotransferase (AST/ALT); glicémia; ferritémia e pesquisa de mutações no gene que codifica a proteína da hemocromatose (HFE) (41); níveis de ácido fólico e vitamina B12; anemia; número de plaquetas e de leucócitos; tempo de protrombina e a detecção de autoanticorpos (42) e (ii) cálculo do *score* de fibrose na NAFLD (NAFLD *fibrosis score*) (43) que permite caracterizar o estadio fibrótico em todos os indivíduos, através do somatório de um conjunto de parâmetros numéricos, rotineiros (idade e índice de massa corporal (IMC)) e de marcadores clínico-laboratoriais (número de plaquetas, concentração sérica de albumina e rácio AST/ALT (20).

Apesar dos avanços nos métodos de diagnóstico não-invasivos, seria importante apostar na criação de um método de imagem suficientemente potente, capaz de competir com a biópsia do fígado, de forma a identificar o estadio da NAFLD.

Estas lacunas, aliadas à falta de um procedimento para avaliação do prognóstico, têm intensificado o estudo de outros biomarcadores como a proteína de ligação aos ácidos gordos (*adipocyte fatty acid binding protein*) (44), o fragmento sérico de citoqueratina-18 (*blood cytokeratin 18 fragment*) (45), o factor de crescimento de fibroblasto-21

(*fibroblast growth factor 21*) (46)) e outros marcadores de *stress* oxidativo; de inflamação e de resistência à insulina, que possam ser indicativos de anomalias do metabolismo geral e hepático.

Quanto à terapêutica, não existe, até à data, uma terapia específica para a NAFLD. As opções terapêuticas adoptadas (*tabela 1*) visam à melhoria da sintomatologia e/ou intervenção nas co-morbilidades associadas.

Tabela 1. Estratégias terapêuticas e efeitos sobre alguns parâmetros da NAFLD
(adaptado de (6))

Intervenção	Tratamento	AST/ALT	Esteatose hepática	NASH	Fibrose
Estilo de vida	Dieta	+	+	+	
	Exercício físico		+		
Perfil lipídico	Fibratos	+			
	Estatinas	+		+	
	Ácidos gordos polinsaturados	+	+		
DM2/resistência à insulina	Metformina	+	+/-	+/-	+/-
	Thiazolidinediones		+	+	+/-
Receptores canabinoide-1	Rimonabanto (*)		+		+
Lipase gástrica e pancreática	Orlistato (?)				
Receptores da angiotensina II	Bloqueadores dos receptores da angiotensina II (?)				
Stress oxidativo	Agentes anti-oxidantes	+			
	Ácido ursodesoxicólico	+			
	Extracto de chá verde (catequinas)		+	+	
Factor de necrose tumoral- α (TNF- α)	Pentoxifilina	+	+	+	
Flora intestinal	Probióticos (?)				
Incretinas	Análogos do péptido 1 semelhante ao glucagon (GLP-1) e inibidores da dipeptidil peptidase IV (DPP-IV)			+	
Outros	Mimetizadores de hormonas tiroideias		+		
Cirurgia bariátrica			+	+	+

Símbolos da tabela: +: Efeito benéfico do tratamento sobre o parâmetro; +/- : Efeito moderado do tratamento sobre o parâmetro; *Portugal deixou de comercializar; ? Faltam evidências

De todas as opções terapêuticas, a cirurgia bariátrica é a mais poderosa. Uma recente meta-análise (a 15 estudos que incluíram a avaliação de 766 biópsias ao fígado) concluiu que com este tratamento, cerca de 92% e 81% dos casos de esteatose hepática e NASH, respectivamente, eram melhorados enquanto que 70% destes eram completamente revertidos (47).

5. Modelos animais para o estudo da NAFLD

Apesar de já estarem identificados alguns factores de risco para a NAFLD, ainda não foram desvendados todos os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à sua progressão nem é consensual a melhor estratégia terapêutica a utilizar. O estudo da NAFLD em humanos é demorado e acarreta questões éticas no que toca aos métodos de recolha de material biológico e ao teste de novos fármacos. Assim, a utilização de modelos animais torna-se fundamental no estudo desta e outras patologias humanas

permitindo não só ter uma visão integrada dos mecanismos patogénicos como monitorizar a evolução natural da doença sob condições genéticas e ambientais controladas. Mais ainda, estes modelos constituem importantes recursos na identificação de alvos e agentes terapêuticos que possam prevenir ou fazer regredir as doenças. De entre a diversidade de modelos animais existentes (i.e. nematodes, roedores, marsupiais, porcos e primatas) (48–50), a utilização de roedores é a mais vantajosa e mais utilizada no seio da comunidade científica.

Para o estudo da NAFLD podem utilizar-se diferentes tipos de modelos de roedores: (i) os geneticamente modificados (isto é, animais transgénicos e *knockouts* para algumas moléculas-chave); (ii) os dietéticos/nutricionais ou medicamentosos (i.e. animais com a NAFLD induzida por exposição a dietas ou medicamentos) ou (iii) os combinados que conjugam factores genéticos e “ambientais” (11,50,51). Apesar da diversidade de modelos existentes, todos eles devem: reproduzir os padrões histológicos e os mecanismos fisiopatológicos característicos de cada estadio da NAFLD em humanos; desenvolver as comorbidades associadas a esta doença, por exemplo, aumento de peso corporal, resistência periférica à insulina, dislipidémia, disrupção da permeabilidade intestinal, endotoxémia, libertação de adipocinas pelo tecido adiposo, entre outros (52).

5.1. Modelos genéticos

O aparecimento da “era dos *omics*” (i.e. genómica, proteómica e metabolómica) e a possibilidade de mapeamento genético permitem a identificação de genes e das suas variantes que possam estar na biogénese de determinadas doenças e/ou comportamentos humanos. A utilização de modelos genéticos permite correlacionar estes genes e os seus fenótipos, o que traz, indiscutivelmente, vantagens para o estudo dos genes humanos ortólogos. A NAFLD é uma doença multifactorial com um relevante componente genético (53). Deste modo, estão actualmente descritos um vasto número de modelos genéticos que podem ser utilizados para o estudo desta patologia (51,54). De seguida são apresentados os modelos genéticos para o estudo da NAFLD mais utilizados pela comunidade científica.

5.1.1. Murganhos *ob/ob*, murganhos *db/db* e ratos Zucker (*fa/fa*)

O facto de a etiologia da NAFLD estar, frequentemente, associada à hiperfagia alimentar e, conseqüentemente, a quadros clínicos de obesidade tem levado à utilização de murganhos com alterações genéticas na leptina. O primeiro exemplo

corresponde aos murganhos *ob/ob* (i.e. animais da estirpe *C57BL/6* com depleção do gene *Lep^{ob}* responsável pela síntese da leptina (55,56)). Este *background* autossômico recessivo tem severas repercussões fenotípicas, entre as quais, o aumento da ingestão alimentar, a redução da actividade física, o desenvolvimento da DM2 assim como o aumento da síntese endógena de TG nos adipócitos e obesidade bem marcada (57,58). Apesar de estes murganhos também desenvolveram esteatose hepática, contrariamente ao que acontece nos humanos, estes animais não têm uma progressão natural para a NASH sendo necessária a exposição a um segundo estímulo caracterizado pela administração de pequenas doses da endotoxina, lipopolissacarídeo (LPS), pela exposição a etanol ou a dietas hipercalóricas, ou por técnicas de isquémia e reperfusão hepáticas (59–62).

Para além da hipoleptinémia ser considerada um factor de risco para a NAFLD, a resistência à leptina também tem sido associada à patogenia desta doença (63,64). De facto, murganhos *db/db* e ratos *Zucker* (i.e. animais portadores de mutações espontâneas no gene *Lep^{db}* que codifica o receptor da leptina) são obesos, possuem hiperinsulinémia e dislipidémia e desenvolvem esteatose macrovesicular. Contudo, tal como os murganhos *ob/ob*, estes animais também desenvolvem, rapidamente, NASH mas só após a aplicação de um segundo estímulo (50,65).

5.1.2. Murganhos *KK-A^y* e murganhos *knockout* para o receptor 4 da melanocortina

Para além da leptina, o envolvimento do sistema das melanocortinas na patogenia da NAFLD, tem sido suportado pelo estudo de murganhos com alterações nos genes *agouti* e no gene que codifica o receptor 4 da melanocortina (MC4R) (50,51,66).

Os murganhos com genótipo *KK-A^y*, resultantes do cruzamento de murganhos diabéticos *KK* com murganhos de pelagem amarela e *background agouti* (*A^y*) (67), desenvolvem obesidade devido à acção antagonista da proteína *agouti* no sistema nervoso central capaz de promover a hiperfagia alimentar e consequente obesidade (68,69). Mais ainda, estes murganhos apresentam indicadores de resistência à insulina e leptina, condições que favorecem o aparecimento de esteatose hepática. Contudo, tal como nos murganhos *ob/ob*, *db/db* e ratos *Zucker*, os murganhos *KK-A^y* são mais susceptíveis à NASH após um estímulo por dieta ou de endotoxinas (70).

Também a depleção genética do *Mc4r* está associada a um fenótipo de obesidade severa associada a hiperfagia, hiperinsulinémia, hiperglicémia e hiperleptinémia nos murganhos (71). Mais ainda, após exposição a dietas hiperlipídicas, os murganhos *Mc4r* KO desenvolvem esteatose hepática severa e demonstram alterações hepáticas no perfil dos genes lipogénicos (72). Itoh e colaboradores, demonstraram

recentemente que a exposição destes animais a dieta hiperlipídica, durante um ano, leva ao aparecimento de formas mais severas da NAFLD, como a NASH, fibrose e cancro hepatocelular assim como leva ao desenvolvimento de alterações metabólicas sistémicas muito semelhantes às observadas nos humanos (73).

5.1.3. Murganhos transgénicos para a proteína 1 c de ligação ao elemento regulador dos esteróides (SREBP-1c)

Diversos estudos *in vivo* têm associado os factores de transcrição da família das proteínas de ligação ao elemento regulador dos esteróides (SREBPs) ao aumento da expressão hepática de genes lipogénicos e ao desenvolvimento da NAFLD. Particularmente, alterações nos níveis do RNA mensageiro (mRNA) do gene que codifica para a proteína 1 c de ligação ao elemento regulador dos esteróides (SREBP-1c) têm sido observadas em murganhos expostos a diferentes regimes hipercalóricos o que tem suscitado o estudo da contribuição desta molécula na patogenia da NAFLD (74,75). Assim, a utilização de murganhos transgénicos com sobreexpressão da SREBP-1c, têm demonstrado que o desenvolvimento da NAFLD nestes animais está associado à atrofia adiposa, hiperinsulinémia, inflamação e fibrose hepáticas (76–78).

5.2. Modelos induzidos por dietas

Apesar da importância dos modelos genéticos no estudo da NAFLD, o facto de algumas das estratégias genéticas (i.e. mutações monogénicas e/ou sobreexpressão de genes) utilizadas serem raras ou inexistentes em humanos, não permite que os modelos genéticos representem a etiologia desta doença hepática no homem. Deste modo, o recurso a modelos da NAFLD induzidos por dietas constitui uma alternativa, permitindo retirar ilações sobre a contribuição isolada/combinada de diferentes nutrientes na fisiopatologia desta doença da sociedade contemporânea.

5.2.1. Dietas hiperlipídicas

Numa dieta mediterrânea típica, um adulto tem uma ingestão lipídica diária correspondente a 40% do total calórico consumido, contrariando as recomendações nutricionais diárias de 20-30% (79). Estudos epidemiológicos sugerem que, apesar da NAFLD ser uma doença multifactorial, as dietas hiperlipídicas são uma das principais condições subjacentes ao desenvolvimento desta doença e das comorbidades metabólicas que lhe estão associadas (80–82).

Nesta linha, Lieber e colaboradores caracterizaram modelos de ratos *Sprague-Dawley* com NASH induzida por exposição, *ad libitum*, a uma dieta hiperlipídica (i.e. 71% kcal

provenientes de lípidos, 11% e 18% kcals provenientes de HC e proteínas, respectivamente) durante 3 semanas. Estes autores observaram que estes animais desenvolveram hiperinsulinémia e esteatose hepática com o dobro do conteúdo hepático de TG relativamente ao grupo controlo. Mais ainda, as evidências histológicas de esteatose e inflamação hepáticas foram revertidas e os níveis de *stress* oxidativo e insulina plasmáticos foram diminuídos com a cessação da exposição à dieta (83), confirmando o papel destas dietas na patogenia da NAFLD.

Também Zou Y *et al.*, reportaram que a exposição de ratos da mesma estirpe a uma emulsão hiperlipídica (i.e. 77% kcals provenientes lípidos, 14% e 9% kcals derivadas de proteínas e HC, respectivamente) induziu NASH com características muito semelhantes à dos humanos (84). Utilizando modelos murinos da estirpe C57BL/6, Ito *et al.*, descreveram que a administração crónica de uma dieta rica em gorduras (i.e. 60% kcals provenientes de lípidos) provocou lesão hepática característica da NASH nestes animais (85). Deng e co-autores caracterizaram um modelo de murganhos com NASH induzida por ingestão intragástrica de uma dieta hiperlipídica. Estes autores verificaram que após as 9 semanas de tratamento, os animais eram fenotipicamente obesos (como elevada acumulação de gordura visceral), desenvolveram NASH com indícios de fibrose e apresentaram intolerância periférica à glicose, hiperinsulinémia, hiperleptinémia, aumento da expressão dos níveis de mRNA da SREBP-1c, do TNF- α e da leptina no tecido adiposo assim como a redução da expressão genética de algumas adipocinas neste órgão (86).

Para além do teor lipídico, a composição química (i.e. a saturação) das gorduras presentes nestas dietas determinam o desenvolvimento de formas mais severas da NAFLD e o aparecimento de perturbações metabólicas sistémicas. Estudos recentes afirmam que a patologia da NAFLD é mais severa após o consumo de ácidos gordos saturados através de mecanismos que envolvem a indução de *stress* no retículo endoplasmático (RE) e a disfunção mitocondrial, detalhadamente descritos por Leamy e co-autores (87). Nesta linha, Wang *et al.*, demonstraram que ratos *Wistar* expostos a uma dieta rica em gorduras saturadas, desenvolveram esteatose hepática e apresentaram indicadores plasmáticos de *stress* do RE no fígado (88).

Por último, Bayol *et al.*, submeteram ratos do sexo feminino a dietas com alto teor lipídico durante as fases de gravidez ou aleitamento e observaram que a sua descendência era mais susceptível ao aparecimento de doenças hepáticas comparativamente aos respectivos grupos controlo (89), sugerindo que a influência das dietas hiperlipídicas no desenvolvimento da NAFLD começa na vida fetal.

Em conclusão, estes resultados sugerem que as dietas hiperlipídicas constituem uma boa ferramenta para a indução da NAFLD semelhantes à dos humanos, sendo

necessário ter em consideração variáveis como o tempo de exposição à dieta, o seu teor em lípidos e a natureza química destas moléculas e a variabilidade associada à utilização de diferentes espécies e estirpes de modelos animais.

5.2.2. Dietas ricas em frutose

O consumo mundial de bebidas energéticas e refrigerantes tem vindo a aumentar drasticamente traduzindo-se no aumento da ingestão de mono ou dissacáridos de frutose. Diferentes estudos epidemiológicos descrevem que este comportamento é um factor de risco para a NALFD (90–92) sendo estimado que pacientes com esta doença apresentem um consumo de frutose cerca de 2-3 vezes superior comparativamente aos indivíduos saudáveis ou com outras patologias hepáticas (93,94). Estes dados incentivaram o estudo de modelos experimentais da NAFLD induzidos por frutose.

Nesta linha, Kawasaki e colaboradores submeteram ratos *Wistar* a uma dieta suplementada com frutose (700 g/kg) durante 5 semanas, observando que o tecido hepático destes animais apresentava esteatose hepática macrovesicular, distribuída principalmente na zona 1 do ácino, e eventos de inflamação intralobular (95). Ackerman *et al.*, e Armuctu e co-autores chegaram a resultados semelhantes, concluindo que ratos da estirpe *Sprague-Dawley* e *Wistar* albinos, do sexo masculino, quando submetidos a diferentes regimes suplementados com frutose desenvolveram condições iniciais do espectro da NAFLD (96,97).

De acordo com Astrid Spruss *et al.*, a exposição de murganhos, durante 8 semanas, a água de bebida suplementada com frutose (30% m/v) esteve associada ao ganho de massa corporal, ao aparecimento de resistência à insulina e ao desenvolvimento de esteatose hepática caracterizada por um conteúdo hepático de TG cerca de 3-4 vezes superior comparativamente ao grupo de murganhos controlo. Para além das propriedades lipogénicas da frutose, estes autores concluíram que a ingestão desta dieta esteve associada a um excessivo crescimento bacteriano no intestino, ao aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, levando à endotoxémia portal capaz de activar respostas pro-inflamatórias no fígado contribuindo para a patogenia da NAFLD nestes animais (98). Por último, a exposição prolongada a água de bebida enriquecida com frutose (55% m/v) por 16 semanas promoveu a indução de um fenótipo característico da NASH com evidências de fibrose bem marcadas (99). Estes resultados têm atribuído à frutose um lugar de destaque na investigação da patogénese da NAFLD.

5.2.3. Dieta tipo *western* e dieta tipo *fast-food*

Nas últimas décadas a mudança do padrão alimentar ocidental, isto é, a introdução de alimentos processados/industrializados e de novos métodos de confecção têm sido associados ao aparecimento de uma diversidade de doenças metabólicas. Deste modo, a utilização de modelos da NAFLD induzidos por dietas tipo *fast-food* ou tipo *western* constituem uma boa ferramenta para o estudo desta patologia nas sociedades contemporâneas.

Charlton *et al.*, descreveram que murganhos *C57BL/6* expostos a ração tipo *fast-food* (i.e. 40% kcal's provenientes de gorduras com 2% de colesterol) e a água de bebida com alto teor de frutose, durante seis meses, tiveram um ganho excessivo de massa corporal, desenvolveram resistência periférica à insulina e NASH acompanhada por um aumento na expressão de genes pró-fibróticos no fígado. Marcadores de *stress* do RE e de lipotoxicidade foram igualmente observados neste modelo representando assim uma excelente estratégia para o estudo desta patologia em humanos (100).

Em linha com estes resultados, Kanuri e colaboradores reportaram que a ingestão de dieta tipo *western* sob a forma de emulsão, durante 6 semanas, também levou ao aparecimento de esteatose e inflamação hepáticas, e níveis elevados de endotoxemia e glicémia em jejum em murganhos *C57BL/6* (50).

Em conclusão, os resultados destes e outros estudos sugerem que os modelos da NAFLD induzidos por dietas tipo *fast-food* ou *western* são dos mais fiéis à etiologia da NAFLD observada em humanos.

5.2.4. Dieta deficiente em metionina e colina

Contrariamente aos regimes alimentares anteriores, a dieta deficiente em metionina e colina (MCD) é bastante menos calórica (i.e. 10% lípidos e 40% sacarose) mas não menos eficaz na indução da NAFLD. De facto, uma variedade de estudos *in vivo* comprovam que a exposição a esta dieta, por uma ou duas semanas, é suficiente para induzir esteatose hepática em roedores (54). Tal facto deve-se à falta dos nutrientes de metionina e a colina, essenciais para a oxidação- β dos ácidos gordos e produção/secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), levando à acumulação hepática de TG e ao início do espectro da NAFLD (101,102).

Para além disso, a exposição à dieta MCD por mais de duas semanas, levou ao aparecimento de necrose hepatocelular seguida de inflamação lobular e fibrose no tecido hepático destes roedores (50). Evidências de *stress* oxidativo (103), de activação da via de sinalização do receptor 4 do tipo "Toll" (TLR4) e alterações em

algumas citocinas e adipocinas (104) poderão ter contribuído para a patogenia da NAFLD nestes animais.

Apesar da indução de lesão hepática pela dieta MCD ser rápida e severa, este modelo experimental não reproduz na totalidade as anomalias metabólicas associadas à NAFLD observadas em humanos. Por exemplo, a ingestão de dieta MCD não esteve associada a um aumento da massa corporal nos animais, sendo que alguns autores reportaram a perda de 35% (105) ou 50% da sua massa corporal (62) comparativamente ao grupo de animais controlo. Para além disso, Koteish *et al.*, descreveram que o rácio “ peso fígado/peso corporal” não aumentou e que a esteatose apresentava um padrão perivenoso (54,62) contrariamente ao observado nos pacientes com a NAFLD. Para além disso, os efeitos da ingestão de dieta MCD variam consoante a espécie e estirpe utilizadas (106–108) facto que condiciona a extrapolação dos resultados para a espécie humana.

5.3. Modelos combinados

Sahai *et al.*, submeteram murganhos *ob/ob* e *db/db* a uma dieta MCD tendo verificado que estes animais apresentavam níveis sorológicos de ALT superiores e um quadro inflamatório e fibrótico mais severo que os mesmos modelos genéticos não expostos a dieta (109). Também murganhos com depleção genética do receptor- α activado por proliferadores de peroxissomas (PPAR- α) expostos a uma dieta MCD apresentaram um quadro de NASH mais severo que os murganhos WT para este gene mas expostos ao mesmo regime (110,111). Muitos outros modelos que combinam anomalias genéticas com desafios nutricionais têm sido estudados (54,112–114). Esta abordagem oferece a possibilidade de se estudar o papel de genes específicos no contexto da exposição a dietas hipercalóricas.

Apesar dos modelos animais apresentarem muitas vantagens para o estudo da NAFLD, deve ter-se em consideração que o facto de os animais viverem em ambientes totalmente artificiais; de serem expostos a dietas padronizadas e de serem negligenciados aspectos como a actividade física, o ambiente social e factores de *stress* bem como a constituição genética dos animais, não permitem a extrapolação directa dos resultados para humanos.

6. Patogénese da NAFLD

A NAFLD é uma doença multifactorial, cuja fisiopatologia ainda não está totalmente clarificada. Sabe-se que a principal característica desta patologia é a acumulação ectópica de gordura no fígado sob a forma de TG. Apesar destes constituírem as

biomoléculas de excelência para a acumulação energética nos hepatócitos, por apresentarem maior densidade calórica (9 kcal/g) que os HC e as proteínas (4.5 kcal/g e 4 kcal/g, respectivamente) e por serem neutras e insolúveis em meios aquosos, a perda de homeostasia dos seus mecanismos hepáticos de entrada/secreção e síntese/oxidação levam à iniciação do espectro da NAFLD (6,7,115). De acordo com a “hipótese dos dois impactos” (*The Two-Hit Hypothesis*), proposta por Day *et al.*, em 1998 (116), a acumulação de TG no fígado corresponderia ao “primeiro impacto” (*first hit*) ao que se associaria um “segundo impacto” (*second hit*), caracterizado pelo *stress* oxidativo, pela lesão hepática mediada por citocinas, pela hepatotoxicidade mediada por ácidos gordos livres, por concentrações elevadas intra-hepáticas de colesterol, hiperleptinémia, hipoadiponectinémia, e apoptose, que culminariam em necroinflamação e fibrose hepáticas.

Contudo, o diagnóstico da NASH em indivíduos sem evidências de esteatose (117) sugere que estes podem não ser dois estádios sequenciais, o que levou à formulação de uma nova teoria - a “hipótese dos múltiplos impactos” (*The Multiple-Hit Hypothesis*) (52). Segundo este modelo, a desregulação do metabolismo lipídico sistémico e a interacção, simultânea, entre os processos inflamatórios do intestino, do tecido adiposo e do fígado serão responsáveis pela patogenia da NAFLD. Assim, de acordo com esta teoria, a inflamação hepática poderá ser a causa ou a consequência da esteatose, constituindo um elemento-chave para a compreensão dos mecanismos patogénicos da NAFLD.

6.1. Inflamação hepática

O processo inflamatório da NAFLD é complexo e multicelular envolvendo células do parênquima (i.e. hepatócitos), células não-parenquimatosas (que incluem células de *Kupffer* (KC), células endoteliais, linfócitos, células biliares e células hepáticas estreladas) e células extra-hepáticas recrutadas para o fígado. A descoberta das múltiplas funções biológicas das KC (como o reconhecimento de agentes patogénicos, a indução de tolerância imunológica e o papel na homeostasia dos lípidos) tem incentivado a pesquisa do seu papel na imunopatogénese da NAFLD (118–121).

7. As células de *Kupffer*

As KC descritas, pelo anatomista alemão Karl Wilhelm von Kupffer em 1876, como “*sternzellen*” de células estreladas foram, durante alguns anos, consideradas como parte integrante do endotélio dos vasos sanguíneos intra-hepáticos (122). Só em 1898, o patologista Tadeusz Browiecz e colaboradores as redefiniram e caracterizaram,

correctamente, como macrófagos (123). Contudo, só em 1974, através da observação por microscopia electrónica e técnicas de coloração por peroxidases, Wisse as localizou como macrófagos residentes dos canais sinusoidais do fígado (124,125).

Actualmente sabe-se que as KC constituem a maior população do sistema reticuloendotelial (também conhecido como sistema mononuclear fagocitário), representando cerca de 80-90% dos macrófagos residentes no corpo humano, 15% das células hepáticas totais e 20% das células não-parenquimatosas (NPC) (126–128).

Alguns autores afirmam que estas células podem ter origem e/ou ser repostas por monócitos circulantes provenientes de precursores mielóides (129). Contudo, é ainda discutível até que ponto estas células extra-hepáticas podem formar uma população de macrófagos independente quando comparados com os macrófagos hepáticos de origem fetal.

As KC localizam-se, preferencialmente, na região periportal do lóbulo (43%), podendo também encontrar-se na zona média (28%) e na região centrolobular (29%) (126).

Ao nível do lóbulo hepático, as KC encontram-se estrategicamente localizadas na fase luminal do endotélio, podendo migrar ao longo dos canais sinusoidais a uma velocidade média de $4,6 \pm 2,6 \mu\text{m}^2/\text{min}$ (130), o que lhes permite: (i) fazer uma rápida *clearance* de partículas exógenas que ascendem ao tecido hepático através do sistema venoso portal; (ii) eliminar células apoptóticas, detritos celulares e outras partículas endógenas provenientes do hospedeiro; (iii) promover interações com os hepatócitos e outras células através da libertação de uma variedade de mediadores biologicamente activos, que incluem citocinas, quimiocinas, eicosanóides, enzimas proteolíticas, espécies reactivas de oxigénio (ROS) e óxido nítrico; (iv) recrutar células imunitárias extra-hepáticas, tais como neutrófilos, linfócitos T *natural killer* (NK), células NK e monócitos, através da expressão de moléculas de adesão e mecanismos de quimiotaxia e (v) funcionar como células apresentadoras de antígenos, responsáveis pelo processamento e apresentação de antígenos a células T citotóxicas e reguladoras, iniciando a resposta celular adaptativa (131–135).

Estas funções permitem às KC contribuir para a resistência do fígado a estímulos agressivos. Contudo, em condições patológicas, a desregulação da resposta imunológica destas células constitui um elemento-chave no aparecimento/desenvolvimento de diversas doenças.

7.1. As células de Kupffer e a NAFLD

O papel das KC na indução de lesão hepática foi inicialmente associado à fisiopatologia da doença hepática alcoólica (136,137). Quanto às doenças

metabólicas, muitos estudos têm investigado a contribuição dos macrófagos residentes no tecido adiposo, desprezando a sua relação com os macrófagos hepáticos (138).

Recentemente, o facto de a proliferação das KC e a existência de agregados destas células se correlacionarem com o grau de inflamação e severidade histológica da NAFLD em humanos (139,140), incentivou o estudo das KC na patogenia desta doença.

Neste sentido, alguns autores demonstraram que modelos experimentais da NAFLD induzidos por dieta MCD, aos quais foram administrados lipossomas de clodronato (i.e. agente tóxico capaz de depletar as KC), estiveram protegidos do desenvolvimento de NASH (141). Huang e colaboradores chegaram a resultados semelhantes, concluindo que a depleção farmacológica das KC protegeu os ratos *Wistar* do desenvolvimento de esteatose hepática e de resistência à insulina após exposição a dietas rica em lípidos ou sacarose (142). Também Zeng *et al.*, demonstraram que a eliminação das KC, por administração de cloreto de gadolínio, atenuou o aparecimento de resistência à insulina e inflamação hepáticas, melhorando os mecanismos hepáticos de autofagia em murganhos expostos a uma dieta hiperlipídica (143).

7.2. As células de *Kupffer* na patogénese da NAFLD

Como parte do sistema imunitário inato, as KC possuem receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que lhes permitem reconhecer: (i) sinais moleculares exógenos provenientes de microorganismos (como LPS, lipoproteínas, flagelinas, peptidoglicanos, entre outros) designados por padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e (ii) moléculas endógenas provenientes do próprio hospedeiro (por exemplo, proteínas de choque térmico, proteínas nucleares não-histonas com elevada mobilidade electroforética (proteínas HMGB), ácido hialurónico, fibrinogénio, fibronectina, ureia, etc.) definidos como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) ou alarminas (135,144).

De entre os diferentes PAMPs e DAMPs existentes, o LPS, componente da membrana celular das bactérias gram-negativas, é o principal agente envolvido na patogénese da NAFLD. De facto, a maioria dos modelos experimentais para esta patologia apresentam níveis plasmáticos de LPS elevados e uma sensibilidade hepática para esta endotoxina aumentada (59,61). Estudos em modelos animais e humanos com a NAFLD sugerem que a endotoxémia se deve à ingestão de dietas hipercalóricas, principalmente ricas em frutose, responsáveis pela alteração da motilidade do intestino, pela indução de um excessivo crescimento bacteriano e pelo aumento da permeabilidade do epitélio intestinal (145,146). Consequentemente, a ascensão de

elevadas quantidades de componentes bacterianos (i.e. LPS), através do sistema venoso portal, no tecido hepático activaria a resposta imunológica das KC.

Esta resposta é iniciada pelo receptor de LPS que sinaliza através do TLR4 presente na membrana plasmática das KC. O TLR4, membro da família conservada de receptores do tipo “Toll” (TLRs), é essencial à patogénia da NAFLD e a sua depleção genética é suficiente para proteger do desenvolvimento de esteatose, de NASH e de fibrose hepáticas (98,141,147,148).

A nível molecular (*figura 2*), o reconhecimento do LPS pelo TLR4 é mediado pela proteína ligante do LPS (LBP) e por outras duas moléculas designadas por *cluster* de diferenciação 14 (CD14) e pelo factor de diferenciação mielóide 2 (MD2). Após a ligação do LPS ao CD14 e ao MD2, o TLR4 dimeriza e sofre mudanças conformacionais necessárias ao recrutamento intracelular de um conjunto de moléculas adaptadoras que contêm o domínio do receptor *toll*-interleucina-1 (TIR), tais como, a proteína adaptadora contendo o domínio TIR (TIRAP/MAL) ou a molécula adaptadora relacionada a TIRF (TRAM).

Na via dependente do factor de diferenciação mielóide 88 (MyD88), esta molécula interage com a cinase 4 associada ao receptor da (IRAK-4) e com a cinase 1 associada ao receptor da interleucina-1 (IRAK-1). Esta interacção induz a autofosforilação destas cinases e a sua ligação a uma outra proteína adaptadora – o factor 6 associado ao receptor do TNF (TRAF-6). Este factor está envolvido na activação da cinase activada pelo factor de crescimento transformante- β (TAK-1), da proteína 1 de ligação à TAK-1 (TAB-1) e das proteínas 2 e 3 de ligação à TAK-1 (TAB-2/3). Seguidamente, dá-se a activação de outros intermediários (i.e. da cinase do N-terminal de *Jun* (JNK), da proteína p38/cinase activada por mitogénios (p38/MAPK), da cinase regulada por sinais extracelulares (ERK) e do complexo I κ B cinase (IKK)) que levam à transcrição da proteína activadora-1 (AP-1) ou do factor nuclear- κ B (NF- κ B). Estes factores de transcrição induzem a expressão de uma variedade de citocinas pro-inflamatórias (como por exemplo, o TNF- α , a interleucina-1 β (IL-1 β), a interleucina-6 (IL-6) e a interleucina-12 (IL-12)); quimiocinas (como a proteína inflamatória de macrófagos-1 (MIP-1)- α ou β e a interleucina-8 (IL-8)); moléculas de adesão (i.e. molécula 1 de adesão celular (ICAM-1)); moléculas co-estimuladoras; moléculas do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) e moléculas efectoras (péptidos anti-microbianos, ROS e a isoforma indutível da sintase do óxido nítrico (iNOS)).

Por outro lado, a via independente do MyD88 leva à activação do TRAF-6 e da proteína adaptadora contendo o domínio TIR indutora de IFN- β (TRIF) envolvidos na activação indirecta do factor 7 regulador do interferon (IRF-7) e do factor 3 regulador

do interferon (IRF-3) que induzem a expressão e a síntese do interferon- α (IFN- α) e do interferon- β (IFN- β) responsáveis pela reposta anti-viral e anti-bacteriana (149,150).

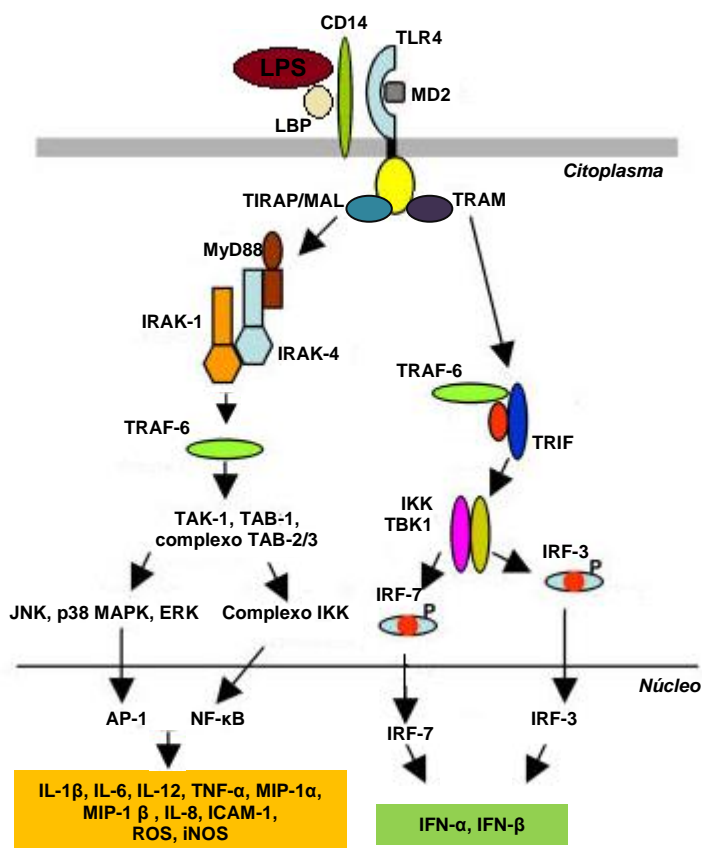


Figura 2. Vias de sinalização intracelular activadas pelo LPS após interacção com o TLR4 em macrófagos (adaptado de (151)).

Enquanto que a activação da via de sinalização pela TRAM e pelo IRF-3 tem sido associada à fisiopatologia da doença hepática alcoólica e à isquémia/reperfusão hepáticas (152,153), outras evidências sugerem que a via dependente do MyD88 contribui para o desenvolvimento da NAFLD. De facto, murganhos *C57BL/6 Myd88 KO* expostos a uma dieta deficiente em colina, durante 22 semanas, apresentaram um quadro clínico de esteatose e inflamação reduzidos comparativamente aos mesmos animais WT (154). Para além disso, a variante genética SNP C558T da TIRAP/MAL inibe a sinalização do TLR4 mediada pelo MyD88, protegendo os pacientes da NAFLD e do aparecimento de fibrose (155).

A activação da via de sinalização pelo TLR4 dependente do MyD88 e do NF- κ B desencadeia uma reposta pró-inflamatória nas KC que inclui o aumento da capacidade em apresentar antígenos (via MHC II) e em produzir citocinas Th1, quimiocinas e ROS que suportam a ideia de que na NAFLD as KC apresentam um perfil de activação clássica, denominado M1 (156–158).

Para além dos PAMPs microbianos, os lípidos presentes no microambiente hepático conseguem modular, directa ou indirectamente, a actividade biológica das KC. O contexto hipercalórico e metabólico da NAFLD, leva à síntese e/ou ascensão hepática de: (i) ácidos gordos não-esterificados (como diacilglicerol, colesterol livre, esteres de colesterol, ceramidas e fosfolípidos) provenientes da lipólise no tecido adiposo; (ii) lípidos ingeridos da dieta e (iii) TG resultantes da lipogénese de novo (LDN). Segundo Donnelly *et al.*, estas moléculas são responsáveis por cerca de 59-60%, 15% e 26% da acumulação de gordura no fígado, respectivamente (159).

Estudos descrevem que as KC provenientes de murganhos expostos a dieta hiperlipídica acumulavam, *in vivo*, colesterol livre e diacilglicerol, tornando-as mais susceptíveis, *in vitro*, a estímulos pró-inflamatórios (como o LPS) comparativamente a KC isoladas de animais não expostos à dieta (160). Para além disso, um outro estudo demonstrou que após a exposição a dieta ricas em gorduras ou perante a estimulação, *in vitro*, com ácidos gordos, as KC tornaram-se activas produzindo concentrações elevadas de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e o interferon- γ (IFN- γ). Neste estudo, o aumento dos níveis do mRNA do *Tlr4* foi também observado nas KC (161).

Também, Kim JK e Lee JY *et al.*, descreveram que os próprios lípidos, reconhecidos pelos TLRs desencadeiam uma resposta celular que contribui para o desenvolvimento de resistência hepática à insulina característica da NAFLD (162–164). Num outro estudo, Lee JY e colaboradores demonstraram que os ácidos gordos saturados são determinantes na activação das vias dependentes do MyD88 e da TRIF, enquanto que as gorduras polinsaturadas inibem estas vias em macrófagos, sugerindo que não só o teor mas a composição dos lípidos consegue modular a actividade imunológica (165). De facto, os lípidos saturados são, extremamente, tóxicos para os hepatócitos mediando o *stress* do RE, a disfunção mitocondrial e a inibição da autofagia nestas células (87,115). Em alguns pacientes, este fenómeno foi associado à lesão e morte celulares e à indução de resposta pró-inflamatória e pró-fibrótica pelas KC (20,119).

Também a acumulação excessiva de lípidos nos hepatócitos é capaz de mediar a actividade biológica das KC. Segundo Farrell e colaboradores, o importe excessivo de lípidos para os hepatócitos, aumenta o volume ocupado por estes, diminuindo o lúmen dos canais sinusoidais e comprometendo a circulação microvascular hepática. Assim, a consequente acumulação de células e outras biomoléculas nestes canais promove a activação das KC (166).

Por último, especula-se que estas células consigam reconhecer os hepatócitos esteatóticos e balonizados desencadeando uma resposta efectora sobre eles (167). Contudo, a existência de um DAMP lipídico capaz de activar as KC permanece ainda especulativa. Para além destes mecanismos, evidências descrevem que os ácidos

gordos conseguem activar o inflamossoma (168) ou receptores do tipo *scavenger-A* contribuindo para o processo inflamatório da NAFLD (169).

7.3. As células de *Kupffer* e o processo fibrótico da NAFLD

A fibrose hepática é uma resposta homeostática que restabelece a integridade orgânica perante uma lesão do tecido. De acordo com os postulados de Friedman, este é um processo dinâmico e contínuo de remodelação da matriz extracelular que envolve a activação das células hepáticas estreladas (HSC), isto é, os seus mecanismos de iniciação e perpetuação (170).

A origem da lesão e as interacções entre as células do parênquima (i.e. os hepatócitos) e as NPC determinam a resolução deste processo e/ou a continuidade do mesmo, podendo originar formas mais severas de disfunção hepática.

No contexto da NAFLD, a fibrose pode evoluir para cirrose caracterizada pela perda da arquitectura hepática, formação de nódulos e alterações na vascularização deste órgão, que em 1/3 dos pacientes evolui para cancro hepatocelular (7,14).

O processo fibrótico da NAFLD resulta da deposição excessiva de proteínas da matriz extracelular, principalmente fibras de colagénio (tipo I e III), proteoglicanos e glicoproteínas resultantes da perda de homeostasia entre os mecanismos de síntese e degradação destas. Segundo Xidakis *et al.*, as KC têm uma participação activa no processo fibrótico da NAFLD através da produção de citocinas e factores de crescimento que induzem a transdiferenciação das HSC em miofibroblastos e através da regulação da síntese de metaloproteínases (MMPs) e dos seus inibidores específicos (TIMPs) (171).

Para além dos estímulos solúveis clássicos (i.e. do *stress* oxidativo, das ROS, das células apoptóticas e do LPS), o factor de crescimento transformante- β 1 (TGF- β 1), produzido pelas KC activadas é responsável pela activação parácrina (i.e. iniciação) das HSC, e pelos mecanismos fibrinogénicos que resultam na produção de proteínas da matriz extracelular (172). De facto, o TGF- β 1 parece ser a principal citocina fibrogénica associada ao processo fibrótico de diferentes doenças hepáticas crónicas (173,174), estando descrito que a existência de polimorfismos no gene que codifica para este factor confere susceptibilidade para o desenvolvimento de fibrose (175).

Para além disso, Knittel e colaboradores descreveram que o TGF- β 1 induz a expressão genética de MMPs e do TIMP-1 nas KC (176). Estes resultados comprovam a hipótese de Xidakis *et al.*, e sugerem que as KC conseguem mediar a fibrinogénese impedindo também a resolução deste processo.

Para além disso, Friedman *et al.*, demonstraram que a produção do factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) pelas KC contribui para a proliferação hepática das HSC *in vitro* (177). Mais ainda, as KC activadas produzem o TNF- α , a interleucina-1 (IL-1) e a proteína 1 quimioatraente de monócito (MCP-1), potentes agentes mitogénicos e quimiotáxicos para as HSC (120,178). Num outro estudo observou-se que as KC activadas secretavam o TNF- α e a IL-1 capazes de mediar a sobrevivência, *in vitro*, das HSC através da activação da via de sinalização do NF- κ B. Mais ainda, a co-cultura sem contacto directo entre uma população de KC com outra de HSC, modulou a expressão genética nestas últimas, levando-as a adquirir características fenotípicas bastante semelhantes às observadas em modelos experimentais de fibrose. Dentro deste painel de genes alterados encontram-se a interleucina-6 (IL-6) e o inibidor TIMP-1 (179). Para além disso, evidências recentes sugerem que as KC activadas são capazes de produzir e secretar gelatinases (i.e. MMPs tipo 2) que degradam o colagénio tipo IV induzindo mudanças fenotípicas nas HSC (180). Por último, existem evidências que descrevem que alterações nos mecanismos de autogafia das KC reduzem a capacidade fagocitária envolvida na resolução do processo fibrótico da NAFLD (181). Estas observações permitem concluir que as KC têm um papel crítico no processo fibrótico da NAFLD induzindo mudanças fenotípicas nas HSC.

7.4. As células de Kupffer e as adipocinas no contexto da NAFLD

O tecido adiposo produz uma grande variedade de factores humorais, vulgarmente denominados por adipocinas, que incluem citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, o TNF- α e a IL-6) e hormonas polipeptídicas (i.e. a leptina, resistina, visfatina, e adiponectina) (182). Estas moléculas têm um papel importante na fisiopatologia da obesidade e em algumas das disfunções metabólicas que lhe estão associadas, como é o caso da NAFLD (183).

A leptina é uma hormona peptídica responsável pela sensação de saciedade e por promover o gasto energético. Para além desta regulação fisiológica, estudos descrevem que esta hormona actua no sistema imunitário, estimulando a fagocitose nos macrófagos através da via de sinalização de JAK/STAT (184). Relativamente às KC, Shen J *et al.*, descreveram que esta hormona poderá induzir mecanismos de resposta pró-inflamatórios (aumentar a produção do TNF- α) (185) e pró-fibróticos (186). Uma vez que a resistência periférica à leptina está presente, na maioria, dos pacientes com obesidade e visto que esta é um factor de risco para a NAFLD, a

hiperleptinemia pode contribuir para a progressão da NAFLD, apesar de este tópico ainda gerar alguma controvérsia.

A resistina é outra adipocina que está associada à desregulação do metabolismo e à imunopatogénese da NAFLD. De facto, estudos recentes indicam que esta hormona promove a acumulação de lípidos nos macrófagos através da indução da expressão genética do receptor do tipo *scavenger-A/CD36* (187). Por último, a visfatina, adipocina do tecido adiposo visceral, também demonstrou ter propriedades pró-inflamatórias através da promoção de produção do TNF- α , da IL-1 β e da IL-6 em monócitos CD14⁺ (188).

Apesar da maioria das adipocinas estar associadas a mecanismos patogénicos da NAFLD, a adiponectina, principal hormona produzida pelo tecido adiposo, parece ter efeitos protectores. Evidências recentes descrevem que indivíduos com esta patologia e comorbidades associadas (i.e. obesidade e DM2) apresentaram níveis inferiores de expressão desta hormona e dos seus receptores comparativamente a indivíduos saudáveis (189). Mais ainda, indivíduos com um quadro inflamatório de NASH apresentaram níveis sorológicos de adiponectina ainda mais inferiores comparativamente aos indivíduos com esteatose hepática simples (190,191). De facto, para além das suas funções no metabolismo (i.e. estimulação da oxidação- β dos ácidos gordos e inibição da síntese hepática de colesterol, TG e glicose) a adiponectina exerce importantes efeitos anti-inflamatórios (182). Apesar de os seus mecanismos ainda não estarem completamente elucidados, pensa-se que estes envolvam a atenuação dos efeitos intracelulares de reconhecimento do LPS nos macrófagos, incluindo, a produção do NF- κ B, IL-6, IL-10, TNF- α e da actividade de ERK1/2 (192–194). Também Thakur e colaboradores descreveram que adiponectina inibe a resposta inflamatória das KC células face ao LPS através dos mecanismos anteriores (195).

Apesar de já terem sido identificados algumas moléculas de origem hepática e sistémica que podem contribuir para a activação da resposta pró-inflamatória das KC, poderão existir outras que ainda não estão identificadas.

8. O *Cluster* de diferenciação 26 (CD26)

O *cluster* de diferenciação 26 (CD26) é uma glicoproteína complexa, com cerca de 110 kDa, que se pode encontrar sob a forma solúvel no plasma sanguíneo ou sob a forma transmembranar numa variedade de células, incluindo células endoteliais, epiteliais e do sistema imune (196).

O seu gene foi sequenciado em humanos, em 1992 (197), e codifica uma proteína transmembranar do tipo II, com 766 aminoácidos, composta por três domínios

diferentes (i.e. um domínio de glicosilação, um domínio rico em cisteínas e um domínio catalítico) que lhe conferem uma diversidade de funções biológicas (*figura 3*).

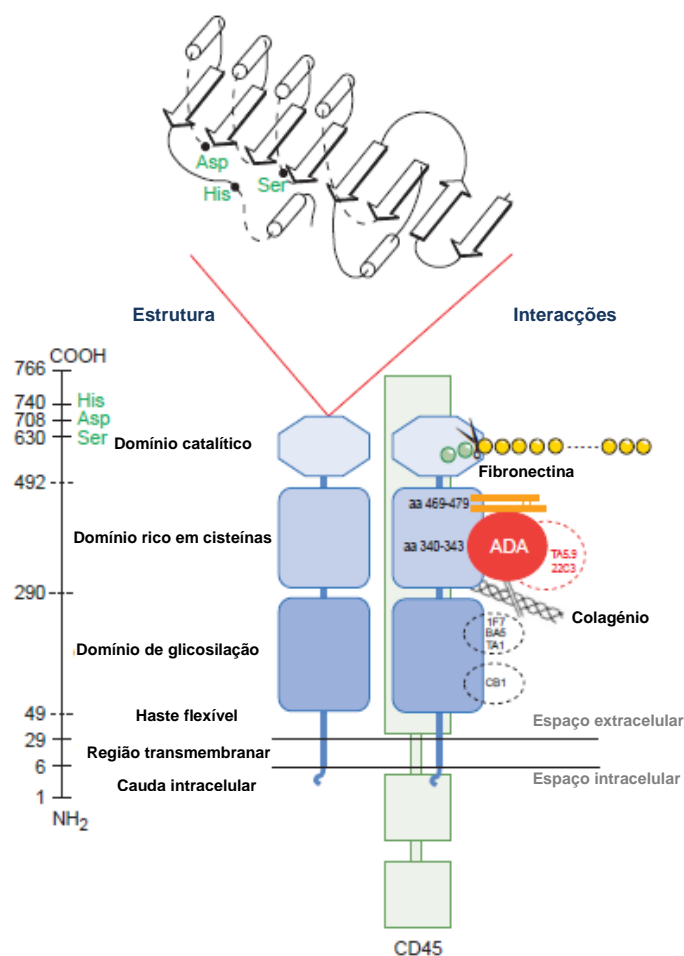


Figura 3. Representação esquemática do CD26 na superfície membranar de uma célula T
(adaptado de (196))

O seu domínio catalítico, formado por uma serina-peptidase, apresenta actividade enzimática de dipeptidil-peptidase-IV (DPP-IV) capaz de degradar di-péptidos N-terminais de proteínas com aminoácidos de prolina ou alanina na penúltima posição. Este domínio pode degradar uma variedade de péptidos (i.e. citocinas, quimiocinas, factores de crescimento hematopoiéticos, neuropéptidos e hormonas incretinas), o que ilustra a multifuncionalidade do CD26 (196,198).

Por outro lado, o seu domínio rico em cisteínas tem sido associado a mecanismos de adesão e migração celulares. Há mais de uma década descrito como um receptor de colagénio (196,199,200), Cheng HC e colaboradores descreveram que a presença desta molécula em células endoteliais pulmonares de ratos promoveu a adesão e colonização de algumas células tumorais através da fibronectina (201). Para além disso, a este domínio liga-se à enzima adenosina deaminase (ADA) mediando a resposta imunológica de algumas células (202). A ADA é uma proteína polimórfica que participa no metabolismo das purinas catalisando, irreversivelmente, a desaminação

da adenosina em inosina e amónia. Possui duas isoformas enzimáticas, ADA-1 (presente em linfócitos e monócitos) e ADA-2 (expressa em macrófagos e células activadas por microorganismos).

Ingrid De Meester *et al.*, descreveram que a ausência hereditária da ADA-1 está associada à síndrome de imunodeficiência combinada, sugerindo que a interacção entre CD26-ADA pode estar envolvida em fenómenos de imunorregulação (199,203). Contudo, o papel do CD26-ADA na patologia de doenças crónicas inflamatórias ainda não é conhecido e o facto de esta interacção não ser observada em roedores dificulta a sua pesquisa biológica (204).

Apesar do grande desconhecimento em relação aos ligandos e possíveis acções do CD26, as suas funções no metabolismo e inflamação têm suscitado interesse junto da comunidade científica. Deste modo, Jixin Zhong e colaboradores demonstraram que a expressão genética de DPP-IV em populações de células dendríticas (DC) e em macrófagos do tecido adiposo visceral eram superiores em humanos e roedores obesos e que esta expressão aumentava durante a diferenciação dos monócitos ou pela activação pelo LPS das DC e macrófagos (205).

O facto da actividade enzimática do CD26 estar associada a estados da NAFLD em pacientes pré-diabéticos (resultados não publicados do nosso laboratório) aliado ao facto de esta molécula estar presente na linhagem mielóide e envolvida na resposta ao LPS incentivou o estudo pelo papel do CD26 na activação das KC e na resposta destas na NAFLD.

Este trabalho caracteriza os estadios iniciais da NAFLD induzida por dietas hipercalóricas num modelo de murgancho, analisando a contribuição das NPC, em especial a resposta das KC, bem como o papel da molécula CD26 no processo patogénico.

II. OBJETIVOS

OBJECTIVOS

Apesar da NAFLD estar, frequentemente, associada à obesidade induzida pela hiperfagia de diferentes dietas hipercalóricas, os seus mecanismos patogénicos ainda estão por elucidar. Deste modo, esta tese teve os seguintes objectivos:

1. Caracterizar o impacto da exposição a duas combinações hipercalóricas diferentes (i.e. suplementação na água de bebida com glicose (12%*m/v*) e frutose (30%*m/v*) e dieta tipo *Western*) na desregulação do metabolismo sistémico e na indução de lesão hepática característica da NAFLD em modelos murinos.
2. Investigar a contribuição da molécula CD26 na indução da NAFLD em murganhos geneticamente modificados.
3. Caracterizar o papel do CD26 na resposta inflamatória das KC em estudos *in vitro*.

III.MATERIAIS E MÉTODOS

1.2. Reagentes

Tabela 1. Reagentes utilizados e respectivas referências.

Reagentes	Referências
D-(-)-Frutose	<i>Panreac, USA</i>
D-(+)-Glucose	<i>Sigma, FRA</i>
Harlan-Teklad 88137 Western Diet	<i>Harlan Laboratories, GBR</i>
<i>kit ImmPRESS™ REAGENT KIT Anti-Mouse Ig</i> (mouse adsorbed)	<i>Vector Labs, USA</i>
<i>kit RNeasy Mini Kit</i>	<i>QUIAGEN®, DEU</i>
<i>kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit</i>	<i>Roche, DEU</i>
LPS de <i>Salmonella typhimurium</i> L 6511	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>
Ácido palmítico	<i>Sigma-Aldrich, USA</i>

Meio de cultura completo

Meio de cultura RPMI (RPMI 1640 (10x) + GlutaMAX™) (*Gibco®/Life Technologies, USA*), suplementado com 10% (v/v) de soro de bovino fetal (*Gibco®/Life Technologies, USA*), 1mM de piruvato de sódio (*Gibco®/Life Technologies, USA*), 50µM de 2-mercaptoetanol (*Gibco®/Life Technologies, USA*), 10mM da solução tampão Hepes (*Gibco®/Life Technologies, USA*) e 0,1 µg/ml de penicilina + estreptomicina (*Gibco®/Life Technologies, USA*).

Solução de collagenase H

Collagenase H (*Roche, DEU*) (0,75mg/ml) + cloreto de cálcio di-hidratado (*Sigma-Aldrich, USA*) (0,75mg/ml) dissolvidos em tampão de perfusão de fígado (*Gibco®/Life Technologies, USA*).

2. MÉTODOS

2.1. Estudos *in vivo*

2.1.1. Desenho do estudo

Murganhos WT (n=15), fêmeas com 5-6 semanas de idade, foram igualmente distribuídos por três grupos: um grupo de murganhos controlo exposto a ração *standard* para roedores (11% lípidos, 62% HC e 27% proteínas) e a água de bebida (desionizada e autoclavada) (n=5); um segundo grupo de murganhos exposto à mesma ração *standard* para roedores e a água de bebida suplementada com glicose 12% (m/v) e frutose 30% (m/v) (n=5) e um último grupo de animais exposto a ração tipo *Western* (42% lípidos, 43% HC (dos quais 34% sacarose) e 15% proteínas) e a água de bebida (desionizada e autoclavada) (n=5). Relativamente aos murganhos Cd26 KO (fêmeas com 5-6 semanas de idade) foram distribuídos por apenas dois grupos: um grupo de animais controlo exposto a ração *standard* para roedores e a água de bebida (desionizada e autoclavada) (n=4) e por um grupo de murganhos exposto a ração *standard* para roedores e a água de bebida suplementada com glicose e frutose (12% (m/v) e 30% (m/v), respectivamente) (n=5).

Durante as seis de tratamento, todos murganhos tiveram livre acesso às dietas, tendo sido registados os volumes de água e comida diários ingeridos pelos animais. Para além disso, semanalmente foi quantificada a massa corporal dos animais (através do parâmetro antropométrico, peso). À quinta semana de exposição, foi avaliado o controlo glicémico dos murganhos em resposta a um estímulo de glicose oral. No final do tratamento, os murganhos, deixados em jejum durante a noite anterior e colocados em dieta duas horas antes do sacrifício, foram eutanasiados com recurso a um agente inalável (dióxido de carbono), tendo sido recolhido sangue através de punção cardíaca para quantificação dos TG no plasma. Para além disso, foram excisados alguns lobos hepáticos para diferentes ensaios de acordo com o descrito na figura 2.

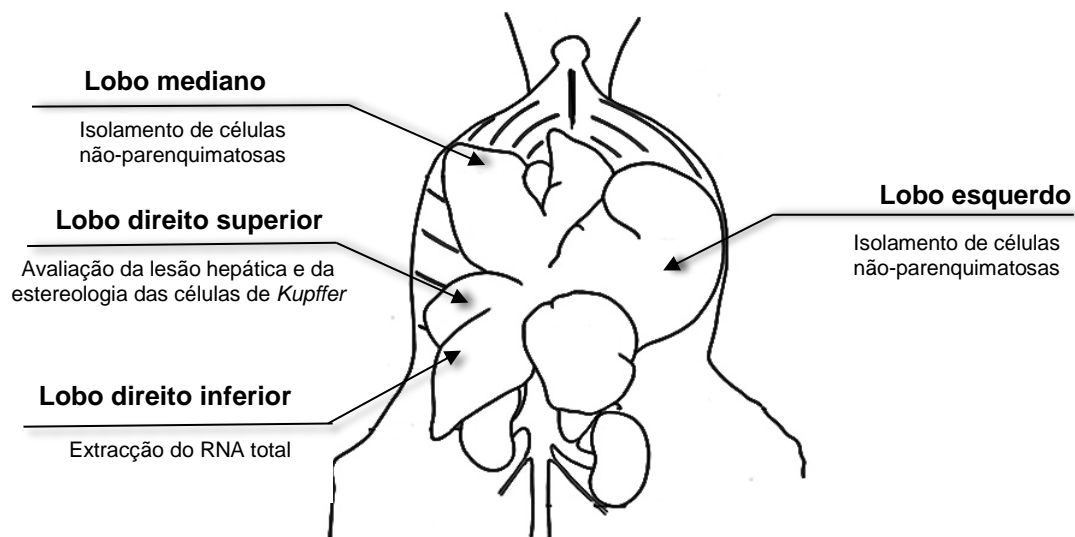


Figura 2. Representação esquemática dos diferentes lobos hepáticos do murganho e destinos experimentais dos mesmos (adaptado de (207)).

O lobo esquerdo e a fracção direita do lobo mediano foram utilizados para isolamento das NPC; a fracção superior do lobo direito foi utilizado para a caracterização histológica da lesão hepática e para o estudo da estereologia das KC; a região inferior deste lobo foi utilizada para a extração do RNA total para os ensaios de avaliação da expressão genética.

2.1.2. Prova de tolerância à glicose oral

À quinta semana de exposição às dietas foi avaliado o controlo glicémico periférico através de uma prova de tolerância à glicose oral (PTGO). Brevemente, os murganhos, deixados em jejum durante a noite, foram pesados, tendo recebido um *bolus* de D-glicose (1,5 g glicose/kg peso corporal) por gavagem intragástrica. A partir de punção da veia caudal, foram registados os valores de glicémia imediatamente antes e 15, 30, 60 e 120 minutos após a gavagem oral, utilizando um glicosímetro CONTOUR®XT e tiras de teste de glicémia da mesma marca (*Bayer HealthCare*, CHE). A excursão glicémica foi calculada a partir da área sob a curva dos valores de glicémia obtidos durante os 120 minutos da PTGO.

2.1.3. Quantificação de triglicerídios no plasma

A concentração plasmática de TG dos murganhos no final do tratamento foi determinada, através do *kit Triglycerides GPO-POD* (*SPINREACT*, ESP), por um método enzimático colorimétrico que segue o princípio descrito na figura 3.

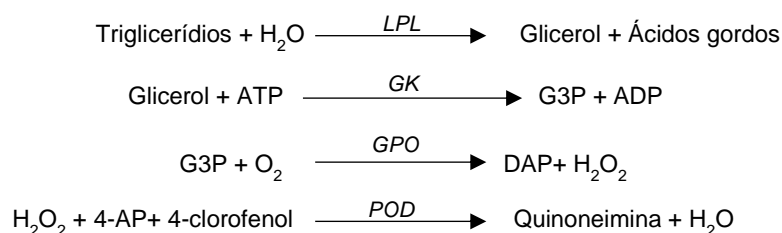


Figura 3. Princípio enzimático do método para quantificação de triglicerídios plasmáticos. Os TG sofrem acção da lipoproteína lípase (LPL), originando moléculas de ácidos gordos e uma molécula de glicerol, que é, posteriormente, convertida em glicerol-3-fosfato (G3P) pela cinase do glicerol (GK). O G3P é oxidado pela enzima glicerol-3-fosfato oxidase (GPO) originando fosfato de di-hidroxiacetona (DAP) e peróxido de hidrogénio (H₂O₂). Por fim, através de uma reacção oxidativa catalisada pela peroxidase (POD), o H₂O₂ reage com a 4-aminofenazona (4-AP) e com o 4-clorofenol, produzindo a quinoneimina (composto de cor vermelha), cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de TG presentes na amostra.

O procedimento experimental é descrito brevemente: preparam-se oito amostras-padrão por diluição seriada, 1:50 em soro fisiológico, da solução de TG *stock* (200 mg/dl) do *kit Triglycerides GPO-POD*. Revestiu-se uma placa de ELISA Nunclon® (*Thermo SCIENTIFIC*, DNK) com 15 µl das amostras-padrão e 5 µl das amostras de plasma sanguíneo. De seguida adicionou-se respectivamente 135 µl e 145 µl do reagente de trabalho do *kit* (i.e. da mistura de enzimas envolvidas na degradação enzimática de TG) às amostras anteriores. Incubou-se por 5 minutos e quantificou-se a densidade óptica das amostras a 490-546 nm com um leitor automático de microplacas VICTOR3™ (*Perkin-Elmer precisely*, FIN).

2.1.4. Avaliação histo-patológica do tecido hepático

No fim do tempo de exposição às dietas, a porção superior do lobo hepático direito foi excisada e fixada em formalina tamponada 10% (v/v), cortada macroscopicamente em 3 fragmentos e processada para inclusão em parafina. Secções histológicas transversais, de 3 µm de espessura, destas amostras foram coradas com hematoxilina-eosina (*Sigma*, USA) ou carstairs (*Electron Microscopy Sciences*, USA) e analisadas por um patologista segundo os critérios de classificação histológica validada pela *Pathology Committee of the NASH Clinical Research Network* (208).

2.1.5. Análise histológica das células de Kupffer

2.1.5.1. Imuno-histoquímica

Para o estudo estereológico da área total ocupada pelas KC no tecido hepático destes murganhos começou-se por realizar ensaios de imuno-histoquímica para marcação do epítipo F4/80. Deste modo, cortes histológicos transversais com 3 µm de espessura do lobo hepático direito de murganhos expostos e não expostos às dietas

hipercalóricas foram desparafinadas em xileno e hidratadas em concentrações decrescentes de álcool etílico (100%, 95%, 70% (v/v)) com o último passo em água destilada. Seguiu-se a recuperação antigénica por altas temperaturas (95-100°C) do epítipo F4/80 em tampão 10mM Citrato de Sódio (*Sigma-Aldrich*, USA) com Tween-20 (0,05% v/v) (*Calbiochem*, USA) a pH 6,0. Delimitaram-se as amostras com caneta hidrofóbica (DAKO, DNK) e lavaram-se as mesmas com a solução de lavagem PBS (1x) + Tween-20 (0,01% (v/v)). As amostras foram, posteriormente, incubadas com H₂O₂ (3% (v/v)) (*Sigma-Aldrich*, USA) durante 10 minutos, de forma a bloquear a actividade das peroxidases endógenas, ao que se seguiu um segundo bloqueio, de 20 minutos, com soro de cabra (*ready-to-use* (2,5% v/v) *normal goat blocking serum*, do kit *ImmPRESS™ REAGENT KIT Anti-Mouse Ig* (*Vector Labs*, USA) para evitar possíveis ligações inespecíficas antígeno-anticorpo. Incubou-se com o anticorpo primário *Rat anti-mouse F4/80 (AbD Serotec®/Bio-Rad Laboratories*, USA) diluído (1:50) em *normal goat blocking serum*, durante 60 minutos. Efectuaram-se mais 3 lavagens (5 minutos cada) com recurso à solução lavagem descrita anteriormente. As amostras foram incubadas, durante 30 minutos, com o reagente ImmPRESS™ (do kit *ImmPRESS™* anterior) correspondente ao anticorpo secundário *Anti-Rat IgG* conjugado com um micropolímero de peroxidases. Seguiram-se outras 3 lavagens como as descritas anteriormente. O substrato 3,3'-Diaminobenzidina (DAB) diluído (1:10) no seu diluente (*Roche*, DEU), foi incubado com as amostras, durante 3 minutos, em câmara escura. Como contraste, adicionou-se hematoxilina de Mayer (*Sigma-Aldrich*, USA) para coloração dos núcleos ao que se seguiu a montagem das amostras.

2.1.5.2. Quantificação estereológica das células de Kupffer

Para a quantificação da área ocupada pelas KC foram obtidas de cada animal fotomicrografias de 5 campos aleatórios de preparações coradas como descrito acima. As imagens foram adquiridas em microscópio *Leica DM LB2* usando a objectiva 40x 0.75NA. Através do *software* de processamento de imagem (*Fiji Is Just Image J*) foi quantificada a área ocupada pelo sinal F4/80 (área castanha) nas imagens adquiridas usando o plug-in *Colour Deconvolution* (figura 4). Esta área foi dividida pela área total do campo óptico previamente definida. O valor total de área ocupada pelo sinal F4/80 em cada animal foi obtido pelo somatório dos valores da área calculada nos 5 campos definidos.

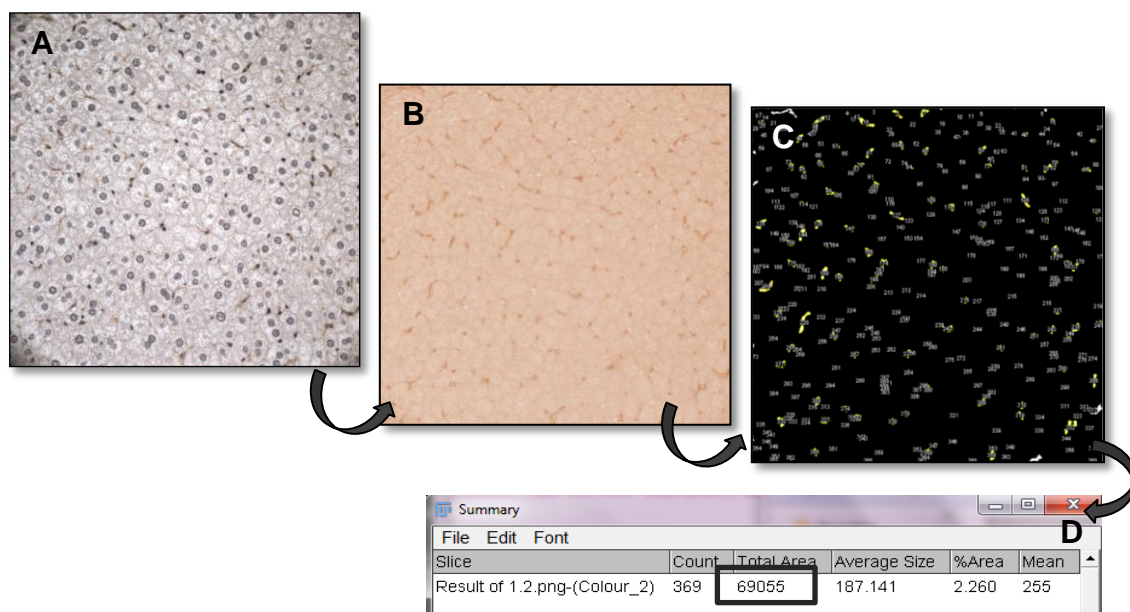


Figura 4. Processamento e análise de imagem para o cálculo da área ocupada pelo sinal F4/80 no tecido hepático de murganinhos expostos às dietas hipercalóricas. Aquisição de imagens aleatórias (com área predefinida de $3055504 \mu\text{m}^2$), em microscópio óptico *Leica DMLB2* equipado com câmara a cores IDS e usando a objectiva $40\times 0.75\text{NA}$, de secções histológicas hepáticas coradas por imuno-histoquímica (A); Utilização do *plug-in Colour Deconvolution* no software de imagem (*Fiji Is Just*) *Image J* (B); Selecção e medição da área ocupada pelo sinal F4/80 após segmentação com a ferramenta *threshold "Yen"* (C) e registo do valor da área total ocupada pelo sinal de F4/80 na imagem previamente binarizada (D).

2.1.6. Isolamento das células não-parenquimatosas

As NPC dos murganinhos foram isoladas por digestão enzimática e disrupção mecânica. Deste modo, os lobos esquerdo e mediano direito foram excisados e perfundidos *ex vivo*, com uma solução de collagenase H (descrita em materiais), por uma bomba peristáltica. Os lobos perfundidos foram gentilmente macerados em pratos para cultura de tecidos (*SARSTEDT*, USA) com tampão de perfusão de fígado. O homogeneizado celular foi passado por filtros de *Nylon* de $70\mu\text{m}$ (*FALCON*®, USA) e centrifugado ($478\times g$, 10 minutos, 20°C). O *pellet* celular foi recuperado e ressuscitado em meio de cultura RPMI sendo posteriormente adicionado a tubos *sterilin* com *Percoll*® 60% (v/v) (*Sigma*, USA). Seguiu-se uma centrifugação, sem travagem, a $1300\times g$ durante 20 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 15ml de meio RPMI completo (descrito em materiais). Seguiu-se uma centrifugação ($478\times g$, 7 minutos, 4°C). Aspirou-se o sobrenadante e incubou-se o *pellet* celular com tampão de lise de eritrócitos (ACK) (*Thermo Fisher Scientific Inc*, USA) durante 2 minutos. Adicionou-se meio RPMI completo e centrifugou-se ($478\times g$, 7 minutos, 4°C). Descartou-se o sobrenadante e ressuscitou-se o *pellet* celular em meio RPMI completo. Seguiu-se um passo de eliminação de hepatócitos, por centrifugação a $50\times g$, 4°C durante 4 minutos.

Recuperou-se o sobrenadante, correspondente à fracção enriquecida em NPC. Centrifugou-se (478xg, 7 minutos, 4°C) e adicionou-se 1 ml de meio RPMI completo às NPC depositadas.

Por fim, fez-se uma avaliação quantitativa da viabilidade da suspensão celular obtida, incubando uma fracção de NPC com corante azul de tripano (*Sigma-Aldrich*, DEU), numa diluição de 1:10. Procedeu-se à contagem das células que excluem o corante, num hemocitómetro (*BOECO*, DEU).

Por último, as NPC isoladas foram transferidas para um novo tubo *eppendorf*, centrifugadas a 300xg, 5', 4°C; ressuspendidas em PBS (1x) e centrifugadas como anteriormente, sendo guardadas em tampão RLT do *kit RNeasy Mini Kit* (*QUIAGEN*[®], DEU) suplementado com β-mercaptoetanol, conservadas a -80°C, para posterior extracção do RNA total.

2.1.7. Quantificação da expressão génica por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

2.1.7.1. Extracção do RNA de tecido hepático e de células não-parenquimatosas

Para a extracção do RNA total de tecido hepático e de NPC utilizou-se o *kit RNeasy Mini Kit*. A fracção inferior do lobo hepático direito foi, inicialmente, homogeneizada em 1,5 ml de tampão RLT por um homogeneizador de tecidos *T10 basic ULTRA-TURRAX* (*IKA*[®], DEU). O lisado celular foi passado por uma agulha de 25 G acoplada a uma seringa de 1ml estéril e centrifugado (20817xg, 3 minutos, 4°C) recuperando-se o sobrenadante. Seguidamente, adicionou-se etanol 70% (v/v) ao sobrenadante anterior assim como às NPC previamente isoladas. Todas as amostras foram transferidas para colunas, do *RNeasy Mini Kit*, colocadas sobre tubos colectores de 2 ml e centrifugadas (8000xg, 15s, 4°C). Descartaram-se os filtrados dos tubos colectores. Seguiu-se a eliminação do DNA genómico das amostras por adição de 700 µl de tampão RW, do kit anterior, à coluna e centrifugação (8 000xg, 15s, 4°C). Descartam-se os filtrados presentes nos tubos colectores. Seguidamente, adicionou-se 500 µl do tampão RPE, do mesmo *kit*, às colunas e fez-se outra centrifugação nas condições anteriores. Descartaram-se os filtrados. Acrescentaram-se mais 500µl de tampão RPE às colunas e centrifugaram-se (8 000 x g, 2 min, 4°C).

Todas as colunas foram, de seguida, colocadas sobre novos tubos colectores de 1,5 ml. Por fim, eluiu-se o RNA, adicionando- 100 µl de água livre de RNAses às colunas e centrifugando (8 000xg, min,4°C). Após a extracção, o RNA foi quantificado num espectofómetro *NanoDrop ND-1000* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*,USA).

2.1.7.2. Transcrição reversa (Síntese de cDNA)

O ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) de tecido hepático total e de NPC foi sintetizado a partir de 1µg do RNA extraído anteriormente por uma reacção de transcrição reversa seguida de uma reacção de polimerização em cadeia (RT-PCR). Para este ensaio utilizou-se o *kit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche, DEU) de acordo com as instruções e condições do fabricante (29°C por 10 minutos, 48°C por 1 hora, 85°C por 5 minutos).

2.1.7.3. PCR quantitativo em tempo real

As reacções de PCR quantitativo em tempo real foram realizadas em placas de 384 poços (Sigma-Aldrich, USA), cobertas com adesivos ópticos, utilizando o equipamento ABI 7900 HT. Foi utilizado um sistema de quantificação *TaqMan gene expression mix* ou fluorescência *SYBR Green PCR Master Mix* para os seguintes genes (tabela 2).

Tabela 2. Descrição dos genes utilizados para nos ensaios de PCR quantitativo em tempo real de acordo com a nomenclatura disponível na base de dados *Mouse Genome Informatics* (209).

	Nome	Símbolo Sinónimo	Oficial/	Assay ID
Genes lipogénicos	<i>MLX interacting protein-like</i>	<i>Mlxipl/ChREBP</i>	TaqMan	Mm02342723_m1
	<i>sterol regulatory element binding transcription factor 1</i>	<i>Srebf1/SREBP1c</i>	TaqMan	Mm00550338_m1
	<i>acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha</i>	<i>Acaca/Acc1</i>	SYBR Green PCR	-
	<i>fatty acid synthase</i>	<i>Fasn/FAS</i>	TaqMan	Mm00662319_m1
	<i>stearoyl-Coenzyme A desaturase 1</i>	<i>Scd1/SCD</i>	TaqMan	Mm00772290_m1
	<i>diacylglycerol O-acyltransferase 2</i>	<i>Dgat2</i>	TaqMan	Mm00499536_m1
	<i>CD36 antigen</i>	<i>Cd36/FAT</i>	TaqMan	Mm01135198_m1
Genes pró-inflamatórios	<i>EGF module-containing mucin-like hormone receptor 1</i>	<i>Emr1/F4/80</i>	TaqMan	Mm00802529_m1
	<i>arginase</i>	<i>Arg1/Arg-1</i>	TaqMan	Mm00475988_m1
	<i>nitric oxide synthase 2, inducible</i>	<i>Nos2/iNOS</i>	TaqMan	Mm00440502_m1
	<i>toll-like receptor 4</i>	<i>Tlr4/Lps</i>	TaqMan	Mm00445273_m1
	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>	<i>Myd88/-</i>	TaqMan	Mm00440338_m1
	<i>interleukin 1 beta</i>	<i>Il1b/IL-1B</i>	TaqMan	Mm00434228_m1
	<i>tumor necrosis factor</i>	<i>Tnf/Tnfa</i>	TaqMan	Mm00443258_m1
Genes pró-fibróticos	<i>high mobility group box 1</i>	<i>Hmgb1/HMG-1</i>	TaqMan	Mm00849805_gH
	<i>transforming growth factor, beta 1</i>	<i>Tgfb1/Tgfb-1</i>	TaqMan	Mm01178819_m1
	<i>fibronectin 1</i>	<i>Fn1/Fn-1</i>	TaqMan	Mm01256744_m1
	<i>platelet derived growth factor, B polypeptide</i>	<i>Pdgfb/PDGF-B</i>	TaqMan	Mm00440677_m1
Outros genes	<i>dipeptidylpeptidase 4</i>	<i>Dpp4/Cd26</i>	TaqMan	Mm00494538_m1
	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>Gapdh</i>	TaqMan	

As condições da reacção de PCR em tempo real foram as seguintes: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 58°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos.

Os resultados individuais de cada murgancho foram obtidos pelo método CT Comparativo (Método $2^{-\Delta\Delta C_t}$), normalizados para a expressão do mRNA do respectivo controlo utilizando o gene *Gapdh* como controlo endógeno.

2.2. Estudos *in vitro*

2.2.1. Desenho do estudo

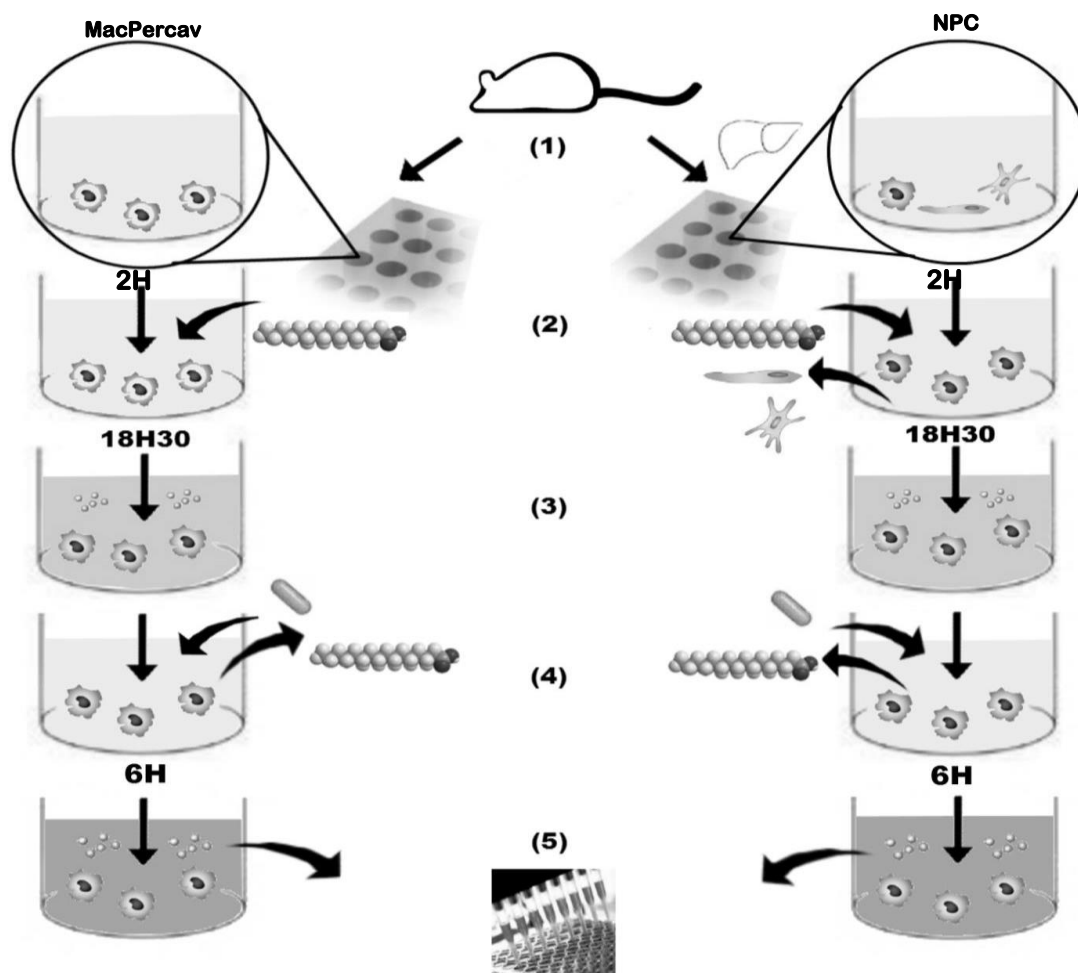


Figura 5. Procedimento experimental utilizado na caracterização do papel do CD26 na ativação das células de Kupffer. (1) Isolamento e cultura, por 2h, de NPC de murganços WTou *Cd26* KO (2) Enriquecimento em KC por remoção do meio de cultura com células endoteliais e HSC em suspensão e adição de meio RPMI completo suplementado com ácido palmítico (AP) (200 ou 400 µM); (3) Estimulação das KC com AP durante 18h e 30'; (4) Eliminação do meio de cultura com AP e estimulação das células com a endotoxina, LPS (0,01µg/ml) durante seis horas; (5) Quantificação da actividade enzimática do CD26 e da concentração proteica do TNF-α e da IL-10 no sobrenadante de cultura. Todo o procedimento anteriormente descrito foi repetido para outra população de macrófagos isolados da cavidade peritoneal dos mesmos animais (lado esquerdo do diagrama).

2.2.2. Quantificação da actividade enzimática do CD26

Para se quantificar a actividade de DPP-IV do CD26 presente no sobrenadante de cultura, recorreu-se a um ensaio fluorométrico contínuo, usando o substrato

fluorogénico, *H-Gly-Pro-AMC.HBr* (BACHEM, Suíça), que é clivado por esta enzima, libertando o produto 7-amino-4-metilcumarina (7-AMC) que é fluorescente.

Resumidamente, revestiu-se uma placa preta de 96 poços, Nunclon® (*Thermo SCIENTIFIC*, Dinamarca) com tampão de ensaio (glicina 50 mM, EDTA 1mM, pH 8,7). Adicionaram-se, em duplicado, os sobrenadantes de cultura, não diluídos. Agitou-se suavemente a placa, durante 2 minutos, num agitador de microplacas. Distribuiu-se 1mM do inibidor competitivo e reversível, Sitagliptina, aos poços respectivos. Agitou-se, novamente, a placa e incubaram-se as amostras com substrato *H-Gly-Pro-AMC.HBr*, diluído 1:25 em tampão de ensaio. Seguiu-se uma nova agitação como as anteriores. Por fim, monitorizou-se a libertação do produto da reacção enzimática, 7-AMC, nos comprimentos de onda de 360 nm (excitação) e 460 nm (emissão) a cada 5 min, para um total de 60 min, através do leitor automático de microplacas *VICTOR*³_{TM}.

2.2.3. Quantificação da concentração proteica de:

2.2.3.1. Factor de necrose tumoral- α (TNF- α)

A concentração de TNF- α presente nos sobrenadantes de cultura foi quantificada através de um ensaio de *ELISA sandwich* e utilizando o *Kit Mouse TNF (Mono/Mono) ELISA Set* (BD Biosciences, USA). Revestiu-se uma placa de *ELISA (MICROWELL PLATE – NUNC, DNK)* com 100 μ l do anticorpo *Anti-mouse TNF- α* diluído (1:250) em tampão de *coating* (Sódio Fosfato 0,2 M, pH 6,5) e incubou-se a 4°C durante a noite. Lavou-se a placa 3x com solução de lavagem - PBS+Tween-20 (0,05% v/v). A reacção foi bloqueada, adicionando 200 μ l de *assay diluent* (PBS+FBS (10%v/v)). Incubou-se durante à temperatura ambiente (*room temperature*, RT) durante 1 hora. Lavou-se a placa como anteriormente descrito e adicionou-se 100 μ l das amostras *standard* e dos sobrenadantes de cultura, previamente diluídos (1:2) em *assay diluent* à placa. Incubou-se durante 2 horas à RT. Lavou-se a placa, 5x, com a solução de lavagem. Adicionou-se 100 μ l com o anticorpo secundário biotinilado, *Biotinylated Anti-mouse TNF*, conjuntamente com a peroxidase conjugada com streptavidina durante 1h à RT. Lavou-se a placa por 7x e adicionou-se 50 μ l do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (*Rat C-peptide Elisa, Mercodia, SWE*). Incubou-se durante 30 minutos, à RT, em câmara escura. Parou-se a reacção enzimática adicionando 50 μ l da solução *Stop* (2NH₂SO₄) (50mM). Quantificou-se a densidade óptica (OD) a 450 nm com o leitor automático de microplacas *VICTOR*³_{TM}.

2.2.3.2. Interleucina-10 (IL-10)

A concentração proteica da citocina IL-10, presente nos sobrenadantes de cultura, foi quantificada por um ensaio de *ELISA sandwich* através do *Kit Mouse IL-10 ELISA MAXTM Deluxe Sets* (Biolegend, USA). Para isso, revestiu-se uma placa de *ELISA* (*MICROWELL PLATE – NUNC, DNK*) com 100 µl do anticorpo *Mouse IL-10 ELISA MAXTM Capture Antibody* diluído (1:200) em tampão de *coating*. Incubou-se a 4°C durante a noite sendo que no dia seguinte, se lavou a placa, 4x, com uma solução de lavagem, PBS+Tween-20 (0,05% v/v). Para bloquear as ligações não-específicas e reduzir o *background* adicionaram-se 200µl de *assay diluent* (1x) tendo-se incubado a placa à temperatura ambiente durante 1 hora. Lavou-se como anteriormente descrito e adicionou-se 100 µl das amostras *standard* e dos sobrenadantes de cultura, previamente diluídos em *assay diluent*, aos respectivos poços, incubando-se, à temperatura ambiente, durante 2 horas. Lavou-se a placa como acima descrito e adicionou-se 100 µl do anticorpo secundário, *Mouse IL-10 ELISA MAXTM Detection Antibody* previamente diluído, durante 1 hora, à temperatura ambiente e sob suave agitação. Lavou-se novamente a placa por 4x e adicionou-se 100 µl de avidina-HRP. Incubou-se à temperatura ambiente, durante 30 minutos, sob suave agitação ao que se seguiu uma lavagem com PBS+Tween-20, por 5x. Adicionou-se 50 µl do substrato TMB durante 30 minutos em câmara escura. Parou-se a reacção enzimática adicionando 100 µl da solução Stop (2NH₂SO₄) (50mM). Quantificou-se a densidade óptica (OD) a 450nm com o leitor automático de microplacas VICTOR³_{TM}.

2.3. Análise estatística

Os resultados dos estudos *in vivo* são apresentados como médias ± erro médio padrão (epm), sendo que a significância das diferenças estatísticas foi avaliada pelo teste estatístico *Mann-Whitney*. Os resultados dos estudos *in vitro* representados como médias ± epm foram analisados pelo teste de *Tukey* (*Analysis of variance*, ANOVA). Todos os resultados foram analisados com recurso ao *GraphPad Prism PC Software*.

IV. RESULTADOS

1. Caracterização de modelos murinos da NAFLD induzidos por dietas hipercalóricas

Foi caracterizado o impacto de duas combinações hipercalóricas na desregulação do metabolismo sistémico e na indução de lesão hepática da NAFLD utilizando como modelo experimental murganhos *C57BL/6*, fêmeas com 5-6 semanas de idade, expostos *ad libitum* a dieta suplementada com glicose (12% m/v) e frutose (30% m/v) na água de bebida (12%G30%F) ou a dieta tipo *Western* (enriquecida em hidratos de carbono e lípidos saturados).

1.1. Ingestão de dieta

Durante as seis semanas de tratamento, verificou-se que os murganhos expostos à dieta 12%G30%F ingeriam diariamente maior volume de água ($5,64 \pm 0,67$ ml/dia) que os murganhos controlo não expostos ($4,47 \pm 0,41$ ml/dia), reflectindo-se numa redução significativa na ingestão diária de ração ($1,85 \pm 0,21$ g/dia) comparativamente ao grupo controlo ($3,24 \pm 0,12$ g/dia). A exposição de murganhos à dieta tipo *Western* provocou um aumento da ingestão de ração ($4,60 \pm 1,19$ g/dia) e um decréscimo significativo na ingestão diária de água ($3,38 \pm 0,15$ ml/dia) relativamente aos animais não expostos à dieta (figura 1.1 A e B).

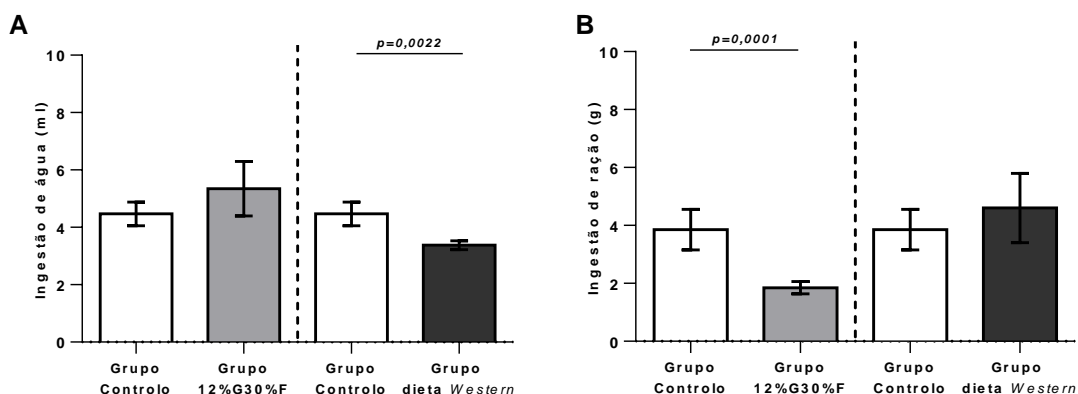


Figura 1.1 Ingestão diária de água e ração por murganho durante seis semanas de exposição a água de bebida suplementada com glicose e frutose ou a dieta tipo *Western*. Estimativa da ingestão diária média de água de bebida (A) e de ração (B) por murganhos expostos a água de bebida com 12% glicose e 30% frutose (Grupo 12%G30%F) ou a dieta tipo *Western* (Grupo dieta *Western*) durante seis semanas, em comparação ao Grupo controlo (n=5). Os resultados são apresentados como média \pm epm após 6 semanas de tratamento. Valores de *p* obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*.

1.2. Ganho de peso e efeitos sistêmicos

Durante o tempo de exposição às dietas, os murganhos do grupo 12%G30%F e dieta *Western* tiveram um aumento progressivo de peso corporal (*figura 1.2 A*), sendo que no fim do tratamento tinham maior peso médio ($5,86 \pm 1,64$ g/murgancho e $5,66 \pm 2,72$ g/murgancho, respectivamente) que o grupo controle ($2,74 \pm 0,69$ g/murgancho) (*figura 1.2 B*). Contudo, apenas o grupo de murganhos exposto à dieta tipo *Western* revelou indícios de redução na capacidade de controlo glicémico durante a PTGO (*figura 1.2 C*) apresentando indícios precoces de dislipidémia pós-prandial comparativamente ao grupo de murganhos controle (*figura 1.2 D*).

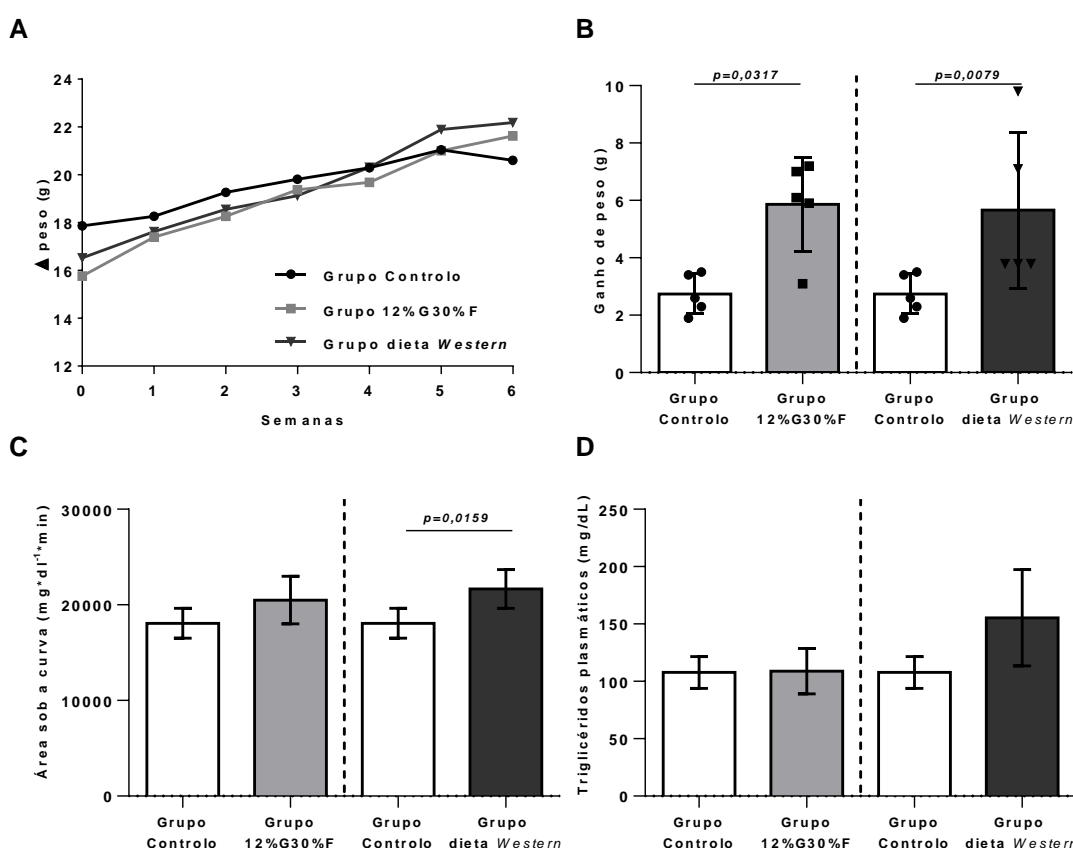


Figura 1.2. Ganho de peso e efeitos sistêmicos em murganhos expostos, *ad libitum*, a dietas hiperenergéticas durante 6 semanas. Variação do peso corporal médio por grupo de murganhos (A) e ganho de peso, por murgancho, ao fim das seis semanas de exposição às dietas (B); área sob a curva dos níveis médios de glicémia, por grupo de murganhos, obtidos durante a PTGO realizada à quinta semana de tratamento (C); valores médios de TG plasmáticos, por grupo de murganhos, no fim do tratamento (D). Os resultados representados sob a forma de barras correspondem aos valores médios por grupo \pm epm ($n=5$). Valores de p obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*.

1.3. Patologia hepática

A ingestão das dietas hiperenergéticas esteve associada ao desenvolvimento de estadios iniciais da NAFLD. Mais especificamente, 4 murganhos (80%) do grupo

12%G30%F e 5 murganhos (100%) do grupo dieta *Western* apresentaram evidências histológicas de esteatose (macro- e microvesicular) de grau 1 ou 2 (*tabela 1.1*), distribuída principalmente na zona 1 do ácino (zona peri-portal) (*figura 1.4 C e E*). As regiões centrolobulares surgiram como as zonas com menos alterações ao longo do parênquima. A presença de balonização hepática foi registada em todos os murganhos do grupo dieta *Western* sendo ocasional no grupo 12%G30%F (1/5 murganhos) e ausente no grupo controlo (*tabela 1.1*). Ocasionalmente foi observada inflamação lobular e fibrose nos grupos de murganhos expostos às dietas mas não diferindo do grupo de murganhos controlo (*tabela 1.1*).

Mais ainda, o *score* de actividade da NAFLD, resultante da soma da actividade em esteatose, balonização e inflamação lobular, foi de 1,6 e 2,4 para o grupo 12%G30%F e dieta *Western*, respectivamente, sendo claramente superior ao *score* de 0,6 obtido no grupo controlo.

Tabela 1.1. Classificação histopatológica da lesão hepática em murganhos expostos a diferentes dietas hipercalóricas durante seis semanas. Critérios para a classificação foram adaptados do ‘*Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease*’ proposto por de Kleiner, *et al.*, (208).

		Grupo Controlo	Grupo 12%G30%F	Grupo dieta <i>Western</i>
Esteatose	Grau 0: <5%;	5/5	1/5	0/5
	Grau 1: 5-33%	0/5	3/5	4/5
	Grau 2: > 34-66%	0/5	1/5	1/5
	Grau 3: > 66%	0/5	0/5	0/5
	Total de actividade	0	1	1,2
Balonização celular	Grau 0: ausente	5/5	4/5	0/5
	Grau 1: leve/pouca	0/5	1/5	5/5
	Grau 2: moderada/acentuada	0/5	0/5	0/5
	Total de actividade	0	0,2	1
Inflamação lobular	Grau 0: ausente	2/5	3/5	4/5
	Grau 1: <2focos/20x CO	3/5	2/5	1/5
	Grau 2: 2-4 focos/20x CO	0/5	0/5	0/5
	Grau 3: > 4 focos/20x CO	0/5	0/5	0/5
	Total de actividade	0,6	0,4	0,2
Score de actividade da NAFLD		0,6	1,6	2,4
Fibrose	Grau 0: ausente	5/5	4/5	4/5
	Grau 1: fibrose perissinusoidal	0/5	1/5	1/5
	Grau 2: fibrose perissinusoidal	0/5	0/5	0/5
	com fibrose periportal/portal	0/5	0/5	0/5
	Grau 3: <i>bridging</i>	0/5	0/5	0/5
	Grau 4: cirrose			

*CO: campo óptico

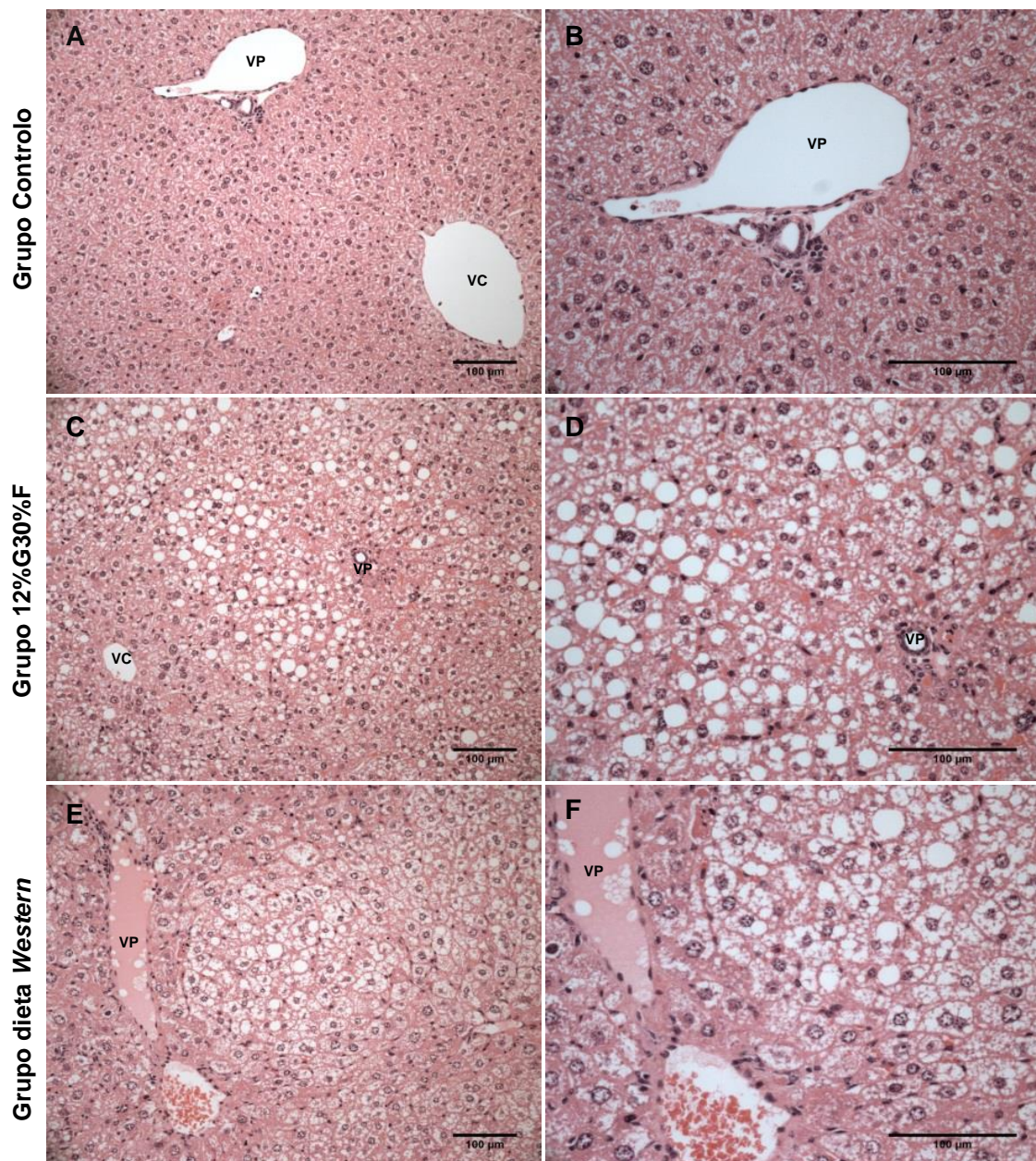


Figura 1.4. Análise histológica da lesão hepática de murganhos sujeitos a diferentes dietas. Secções histológicas transversais, 3 µm de espessura, de fígado de murganhos do grupo controle (A e B), submetidos à dieta de 12%G30%F (C e D) e à dieta tipo *Western* (E e F), por coloração com hematoxilina-eosina. Fotomicrografias adquiridas em microscópio óptico *Leica DMLB2*, com ampliação de 200x (A, C e E) e 400x (B, D e F). VP: veia porta; VC: veia centro-lobular.

1.4. Expressão genética

A ausência de perturbações sistêmicas e concomitante existência de alterações a nível hepático após exposição às duas dietas hipercalóricas permitiu focar a análise nos estadios iniciais do processo patogénico no fígado, isto é, nos mecanismos lipogénicos, inflamatórios e fibróticos.

1.4.1. Genes lipogénicos

Investigou-se a possibilidade de a origem das perturbações histológicas observadas nos fígados dos murganhos do grupo 12%G30%F e dieta *Western* (figura 1.4) se deverem à deposição de lípidos pela via da LDN. Para isso, foram seleccionados para o estudo da expressão genética um painel de genes lipogénicos que codificam para factores de transcrição e principais enzimas envolvidas nesta via enzimática. Foi quantificado por PCR em tempo real o mRNA destes genes no tecido hepático total de murganhos expostos aos dois regimes hipercalóricos e comparados com o grupo de murganhos controlo.

Verificou-se que a expressão dos genes analisados não estava aumentada nos murganhos expostos à combinação de glicose e frutose na água de bebida, sugerindo que os estadios iniciais da esteatose hepática provocada pela ingestão destes monómeros não foram responsáveis pela síntese endógena e acumulação de lípidos no fígado (tabela 1.2). Em contraste, a exposição à dieta tipo *Western* induziu alterações significativas da expressão de vários genes lipogénicos e do *Cd36* (tabela 1.2) sugerindo que a origem da lesão hepática nestes animais se possa dever à intensificação da LDN e ao aumento do importe de lípidos da dieta. Contudo, a diminuição da expressão genética de *Scd1* após a exposição às duas dietas hipercalóricas (figura 1.5 C) sugere a existência de mecanismos de repressão da expressão genética por feedback negativo, que condicionam a interpretação directa destes resultados.

Tabela 1.2. Expressão genética dos factores de transcrição e enzimas lipogénicas em tecido hepático total de murganhos sujeitos a dietas hiperenergéticas. Os valores de *p*- foram obtidos pelo teste de *Mann-Whitney*: grupo 12%G30%F vs Grupo controlo e Grupo dieta *Western* vs grupo controlo.

GENES	Grupo 12%G30%F	Grupo dieta <i>Western</i>
<i>Mlxipl (ChREBP)</i>	ns	ns
<i>Srebf1 (SREBP1c)</i>	ns	↑** <i>p</i> =0,0079
<i>Acaca (Acc1)</i>	ns	ns
<i>Fasn (FAS)</i>	ns	↑* <i>p</i> =0,0317
<i>Scd1 (SCD)</i>	↓** <i>p</i> =0,0079	↓** <i>p</i> =0,0079
<i>Dgat2</i>	ns	ns
<i>Cd36</i>	↑** <i>p</i> =0,0079	↑* <i>p</i> =0,0317

*ns: não difere estatisticamente do grupo controlo

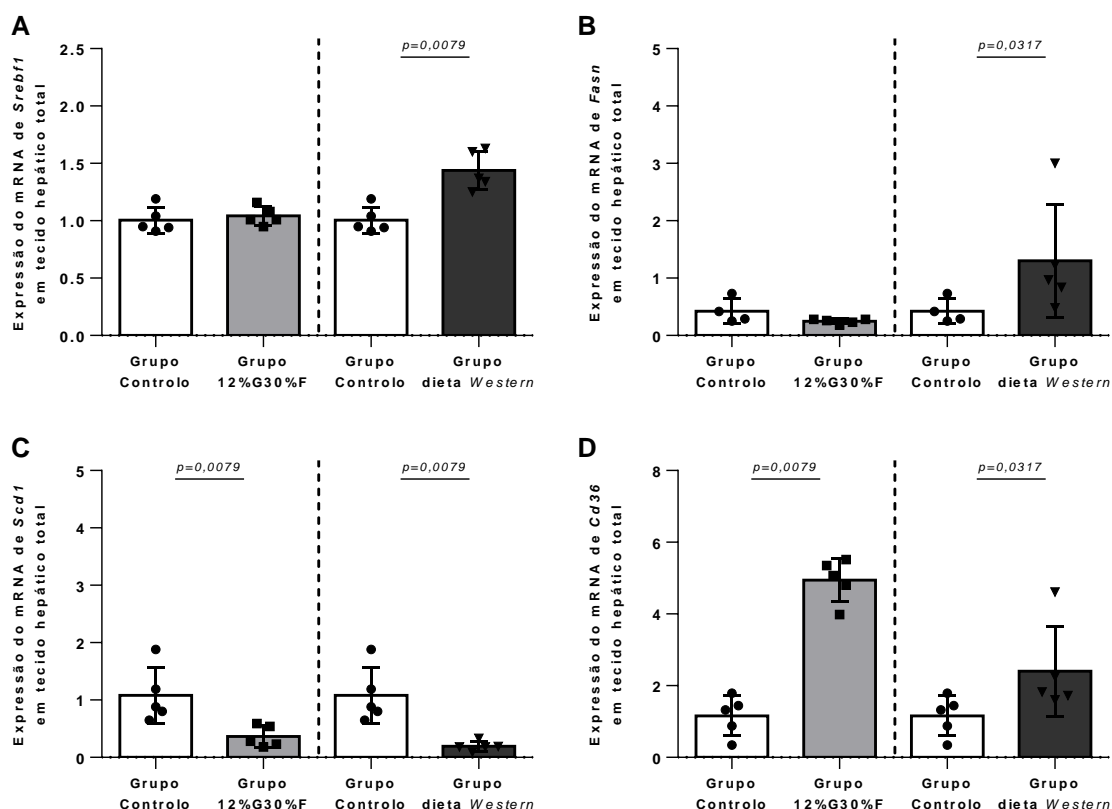


Figura 1.5. Quantificação relativa do mRNA dos genes lipogénicos em tecido hepático total de murganhos expostos à dieta 12%G30%F ou tipo Western. Representação gráfica da expressão genética de genes lipogénicos significativamente alterados pelas dietas (*Srebf1*, *Fasn*, *Scd1* e *Cd36*). Os resultados individuais de PCR em tempo real de cada murganho (representados por símbolos), foram obtidos pelo método CT Comparativo (Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$), normalizados para a expressão do mRNA do respectivo controlo utilizando o gene *Gapdh* como controlo endógeno. As barras representam os valores médios para cada grupo com \pm epm (n=5), após exclusão de valores aberrantes. Valores de p foram obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*.

1.4.2. Genes pró-inflamatórios

Em seguida caracterizou-se a resposta inflamatória induzida pela exposição às duas dietas hipercalóricas. Foram seleccionados para estudos de expressão genética um painel de genes que codificam para enzimas, receptores e citocinas envolvidos na inflamação. Foi quantificado por PCR em tempo real os níveis de mRNA destes genes no tecido hepático total e em preparações de NPC que incluem sobretudo células do sistema imune (como as KC) mas também células endoteliais e HSC.

No seu conjunto, a expressão dos genes analisados estava significativamente aumentada nos murganhos expostos à dieta enriquecida em glicose e frutose em comparação com os animais controlo (*tabela 1.3*) sugerindo que este regime induz uma resposta pró-inflamatória.

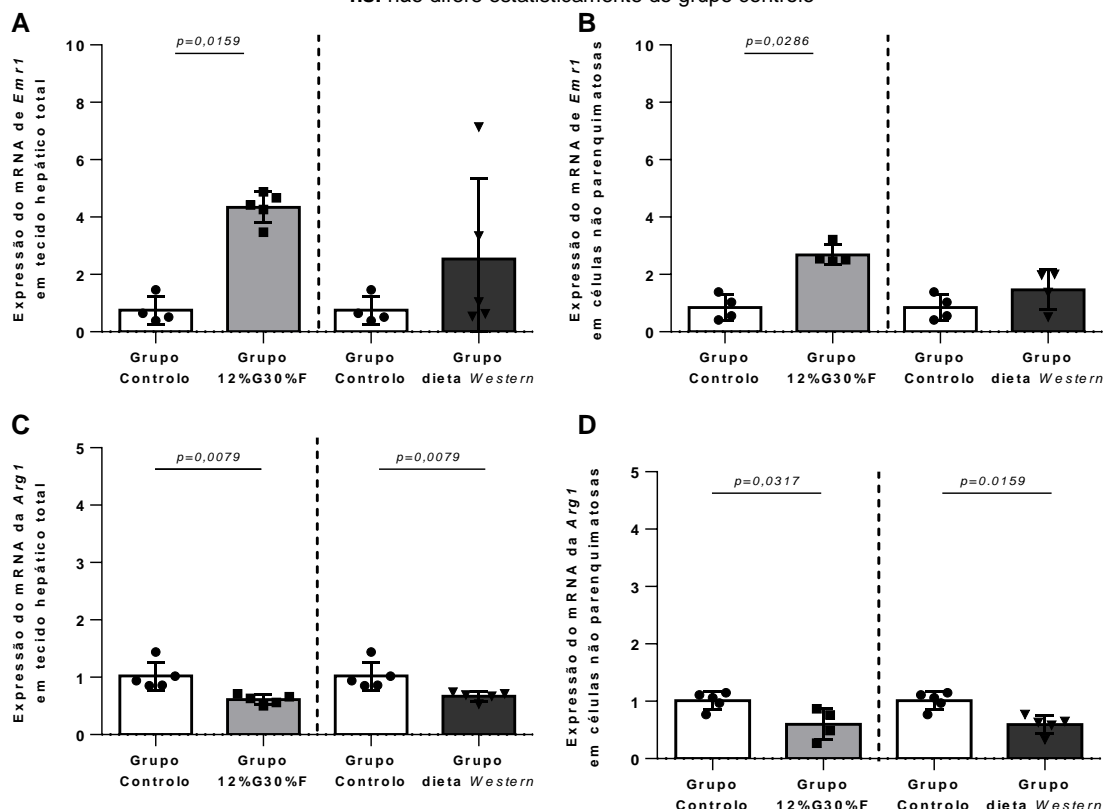
A título de exemplo, observou-se que a expressão genética do *Emr1* (F4/80), marcador das KC, estava aumentada em tecido hepático e NPC destes murganhos (*figura 1.6 A e B*), sugerindo um aumento da proliferação e/ou alteração dos estados de activação das KC dos murganhos expostos ao este regime. Mais ainda, a

diminuição da expressão genética da enzima arginase 1 (*figura 1.6 C e D*) nestes murganhos sugere a alteração de activação nestas células para o perfil M1. Para além disso, o aumento da expressão do *Tlr4* e da *Il1b* sugere a activação e a produção de mediadores de inflamação pelas NPC destes murganhos, que podem ter contribuído para a lesão hepática nestes murganhos. Em contraste, a exposição à dieta tipo *Western*, não induziu um perfil de resposta inflamatória em relação aos animais controlo (*tabela 1.3*), à excepção da diminuição da expressão da *Arg1* (*figura 1.6 C e D*), o que pode indiciar a activação de outras respostas não pró-inflamatórias nas KC.

Tabela 1.3. Expressão genética de enzimas, receptores e citocinas pró-inflamatórias no tecido hepático total e em células não-parenquimatosas de murganhos sujeitos a dietas hiperenergéticas. Os valores de *p* foram obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*: grupo 12%G30%F vs grupo controlo e grupo dieta *Western* vs grupo controlo.

GENES	Grupo 12%G30%F		Grupo dieta <i>Western</i>	
	Tecido hepático total	Células não-parenquimatosas	Tecido hepático total	Células não-parenquimatosas
<i>Emr1</i> (F4/80)	↑* <i>p</i> =0,0159	↑* <i>p</i> =0,0286	ns	Ns
<i>Arg1</i>	↓** <i>p</i> =0,0079	↓* <i>p</i> =0,0317	↓** <i>p</i> =0,0079	↓* <i>p</i> =0,0159
<i>Nos2/iNOS</i>	ns	↑* <i>p</i> =0,0286	ns	Ns
<i>Tlr4</i>	ns	↑* <i>p</i> =0,0159	ns	Ns
<i>Myd88</i>	↑* <i>p</i> =0,0476	↑* <i>p</i> =0,0159	ns	Ns
<i>Il1b</i>	ns	↑* <i>p</i> =0,0159	ns	Ns
<i>Tnf</i> (<i>Tnfa</i>)	↑* <i>p</i> =0,0159	↑* <i>p</i> =0,0286	ns	Ns
<i>Hmgb1</i>	↑* <i>p</i> =0,0159	-	ns	-

*ns: não difere estatisticamente do grupo controlo



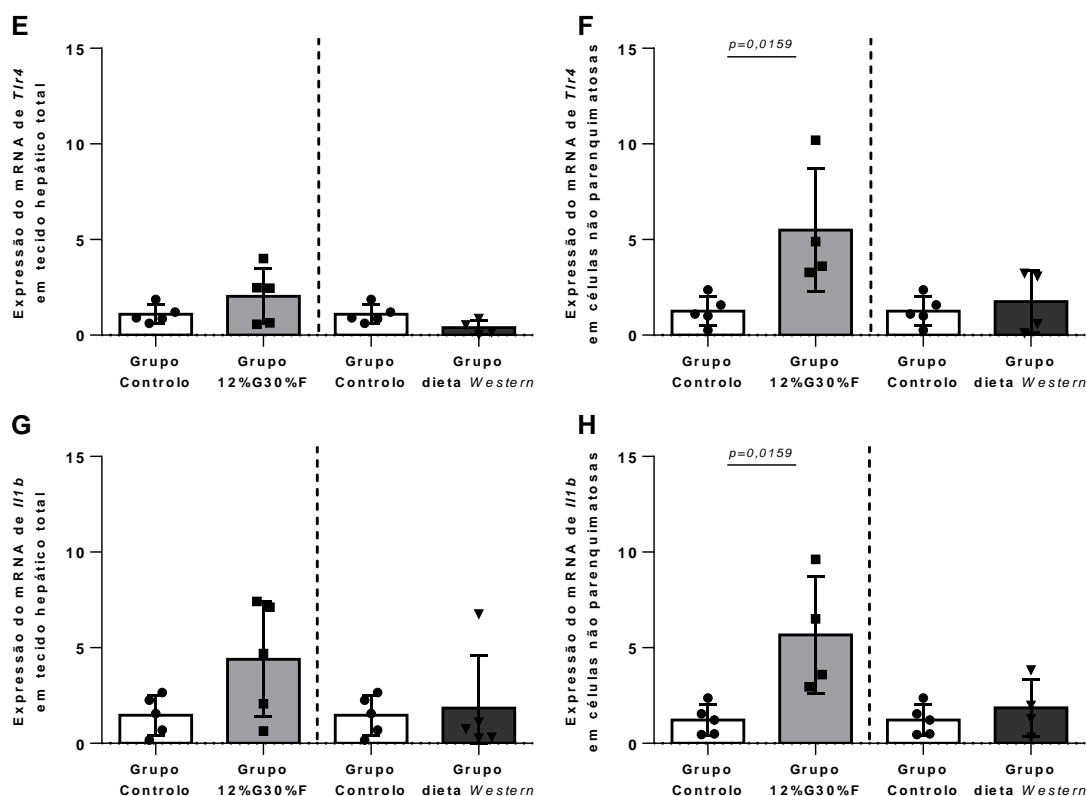


Figura 1.6. Quantificação relativa do mRNA de genes pro-inflamatórios em tecido hepático total e em células não-parenquimatosas de murganinhos expostos às dietas 12%G30%F ou tipo Western. Expressão genética de *Emr1* (A e B), *Arg1* (C e D), *Tlr4* (E e F) e *Il1b* (G e H) por PCR quantitativo em tempo real. Os resultados individuais de cada murganinho (representados por símbolos), foram obtidos pelo método CT Comparativo (Método $2^{-\Delta\Delta C_t}$), normalizados para a expressão de mRNA do respectivo controlo utilizando o gene *Gapdh* como controlo endógeno. As barras representam os valores médios para cada grupo com \pm epm (n=5), após exclusão de valores aberrantes. Valores de *p* foram obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*.

1.4.3. Genes pró-fibróticos

A expressão de genes relacionados com a proliferação celular e com a fibrogénese foi quantificada por PCR quantitativo em tempo real.

A expressão dos genes analisados estava significativamente aumentada nos murganinhos expostos à dieta enriquecida em glicose e frutose em comparação com os animais controlo mas não nos animais expostos à dieta Western (tabela 1.4). Mais especificamente, o aumento da expressão do *Tgfb1* e do *Pdgfb* nas NPC dos murganinhos do grupo 12%G30%F sugere que a activação inflamatória das KC anteriormente observada poderá estar relacionada com o desencadeamento de uma resposta pró-fibrótica. Assim, apesar de não terem sido encontrados evidências histológicas de fibrose (tabela 1.1 e figura 1.4), o aumento da expressão destes genes pró-fibróticos às seis semanas de tratamento sugere que uma exposição mais prolongada a este regime poderá conduzir ao aparecimento de fibrose (figura 1.7).

Tabela 1.4. Expressão de genes pró-fibróticos em tecido hepático total e NPC de murganhos sujeitos a dietas hiperenergéticas. Os valores de *p* foram obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*, testando o grupo controle vs grupo 12%G30%F e grupo controle vs grupo dieta *Western*.

GENES	Grupo 12%G30%F		Grupo dieta <i>Western</i>	
	Tecido hepático	Células	Tecido hepático	Células
	total	não parenquimatosas	total	não parenquimatosas
<i>Tgfb1</i>	↑* <i>p</i> =0,0159	↑* <i>p</i> =0,0159	ns	↑* <i>p</i> =0,0159
<i>Fn1</i>	↑* <i>p</i> =0,0317	ns	ns	ns
<i>Pdgfb</i>	↑* <i>p</i> =0,0159	↑* <i>p</i> =0,0159	ns	↑** <i>p</i> =0,0079

*ns: não difere estatisticamente do grupo controle

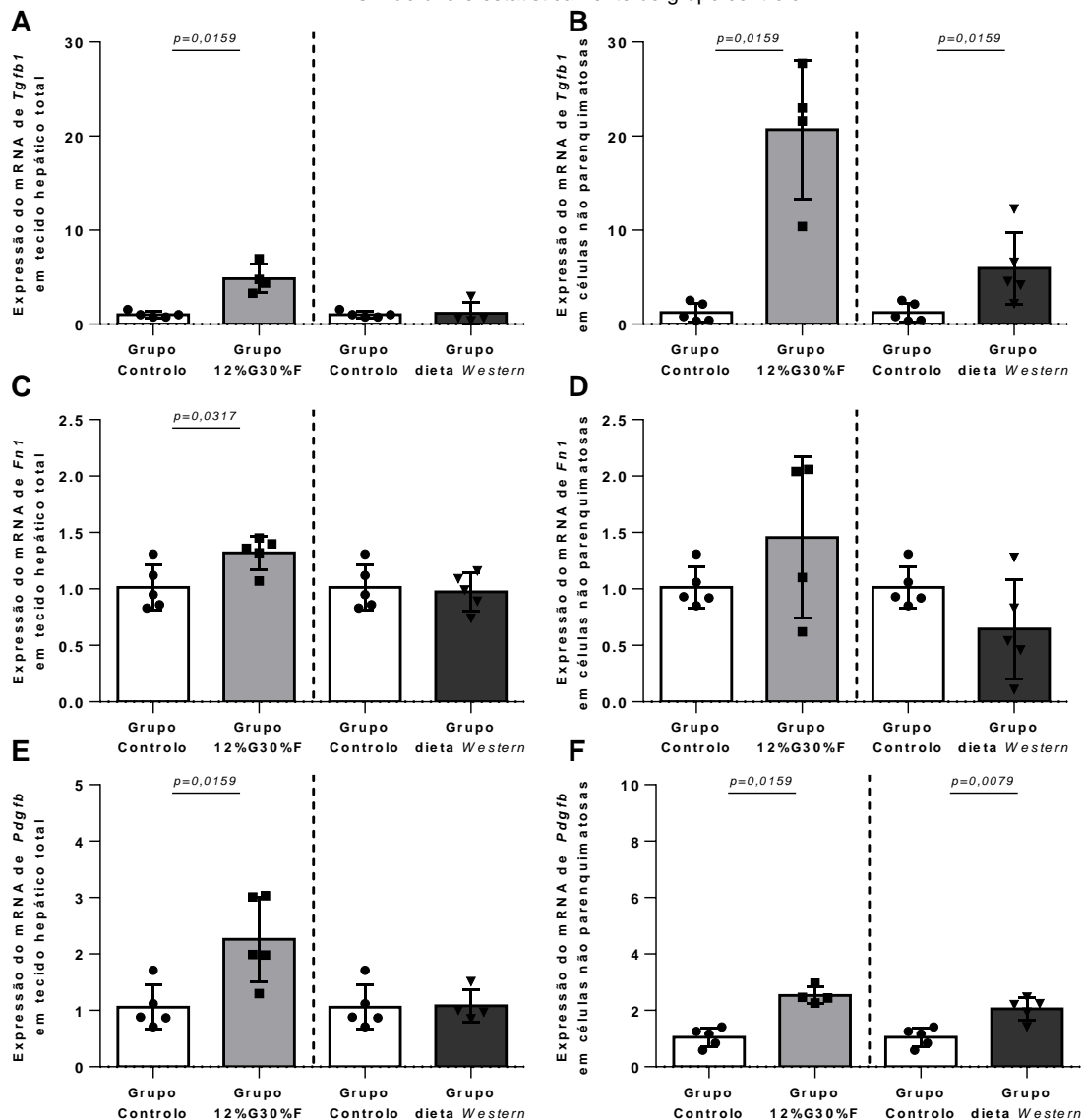


Figura 1.7. Quantificação relativa do mRNA de genes pró-fibróticos em tecido hepático total e em células não-parenquimatosas de murganhos expostos às dieta 12%G30%F ou tipo *Western*. Expressão genética de *Tgfb1* (A e B), *Fn1* (C e D), *Pdgfb* (E e F) por PCR quantitativo em tempo real. Os resultados individuais de cada murganho (representados por símbolos) foram obtidos pelo método CT Comparativo (Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$), normalizados para a expressão de mRNA do respectivo controle utilizando o gene *Gapdh* como controle endógeno. As barras representam os valores médios para cada grupo com \pm epm (*n*=5), excluindo-se os valores aberrantes. Valores de *p* foram obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*.

1.5. Quantificação estereológica das células de *Kupffer*

Para avaliar se as alterações de expressão genética nas NPC poderiam ser causadas por um aumento do número das células monocíticas no fígado foi quantificada a área preenchida por células que expressam F4/80 no fígado dos murganhos expostos e não expostos às dietas hipercalóricas. Verificou-se que a ingestão das duas dietas hipercalóricas não esteve associada à proliferação/acumulação hepática de células F4/80⁺ comparativamente à ingestão de dieta normal (*figura 1.8*). Este resultado conjuntamente com o aumento dos níveis de mRNA do *Emr1* nas NPC de murganhos do grupo 12%G30%F (*figura 1.6 B*) sugerem que a activação das KC pode ter contribuído para a imunopatogénese da NAFLD nos murganhos expostos a este regime hipercalórico.

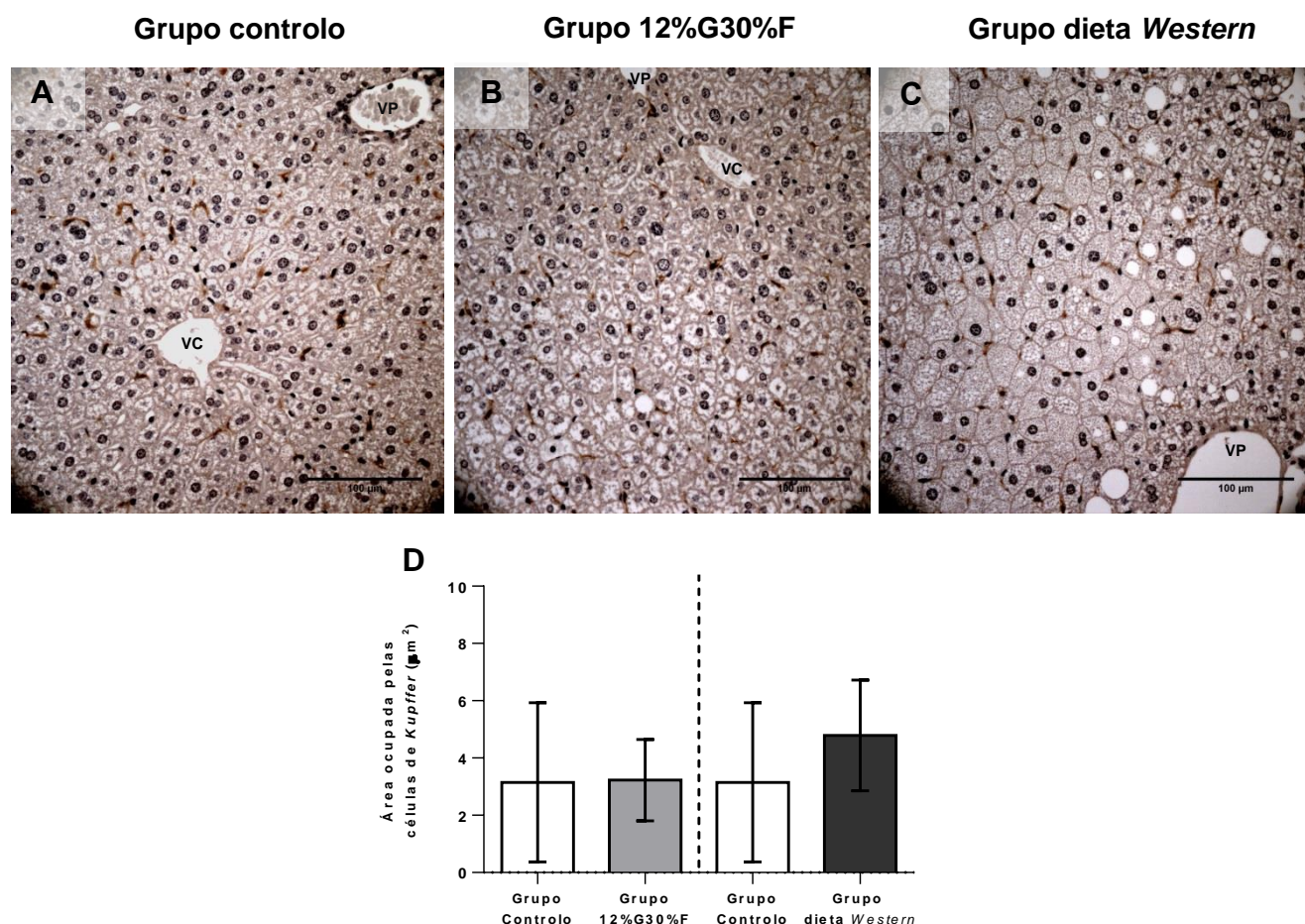


Figura 1.8. Quantificação estereológica das células de *Kupffer* em tecido hepático de murganhos sujeitos a dietas hipercalóricas durante seis semanas. Quantificação da área ocupada pelas células F4/80⁺ (D), em secções histológicas, coradas por imuno-histoquímica, de fígado de murganhos do grupo controlo (A), submetidos à dieta de 12%G30%F (B) e à dieta tipo *Western* (C) processadas pelo software de imagem *Fiji Is Just Image J*. Os resultados são apresentados como média ± epm (n=5), sendo que foram excluídos os valores aberrantes. Valores de *p* foram obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*. Fotomicrografias adquiridas em microscópio óptico *Leica DMLB2*, com ampliação de 400x. VP: veia porta; VC: veia centro-lobular.

2. Contribuição da molécula CD26 na imunopatogénese da NAFLD

2.1. Expressão genética do CD26

O CD26 é uma glicoproteína multifuncional que apresenta uma ampla distribuição anatómica e uma diversidade de funções e substratos biológicos. Evidências recentes realçam o papel desta molécula na regulação metabólica descrevendo que o aumento da sua actividade enzimática está associado à patogénese de algumas doenças metabólicas (como a obesidade, a DM2, a NAFLD, entre outras). Deste modo, analisou-se a expressão genética do *Cd26* no tecido hepático total e em preparações de NPC de murganhos *C57BL/6* expostos às dietas 12%G30%F e tipo *Western* durante seis semanas. Verificou-se que os valores de mRNA do *Cd26* estavam aumentados apenas nas NPC de murganhos expostos à dieta 12%G30%F (figura 2.1 B), sugerindo que esta molécula poderá estar envolvida nos mecanismos inflamatórios da patogénese da NAFLD.

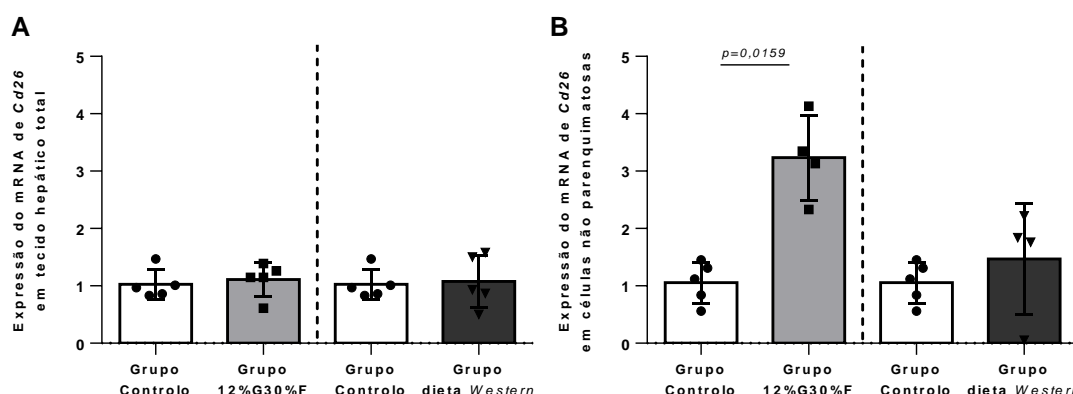


Figura 2.1. Quantificação relativa do mRNA do *Cd26* em tecido hepático total e em células não-parenquimatosas de murganhos WT expostos à dieta 12%G30%F ou tipo *Western* durante seis semanas. Expressão genética do *Cd26* por PCR quantitativo em tempo real. Os resultados individuais de cada murganho (representados por símbolos) foram obtidos pelo método CT Comparativo (Método $2^{-\Delta\Delta C_t}$), normalizados para a expressão de mRNA do respectivo controlo utilizando o gene *Gapdh* como controlo endógeno. As barras representam os valores médios para cada grupo com \pm epm (n=5), sendo que foram excluídos os valores aberrantes. Valores de *p* obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*.

Estes resultados motivaram que fosse estudada a contribuição do CD26 na indução da NAFLD característica de regimes suplementados com HC. Para isso, murganhos, fêmeas com 5-6 semanas de idade, *knockout* para este gene (*Cd26* KO) foram expostos, durante seis semanas, à dieta suplementada com glicose (12% m/v) e frutose (30% m/v) na água de bebida.

2.2. Ingestão de dieta

Ao longo do tempo de exposição à dieta, verificou-se que os murganhos *Cd26* KO com livre acesso a água de bebida com 12%G30%F ingeriram diariamente maior volume de água ($6,51 \pm 1,68$ ml/dia) e menor volume de ração ($1,82 \pm 0,10$ g/dia) que grupo de murganhos controlo não exposto à dieta ($3,69 \pm 0,61$ ml/dia e $2,74 \pm 0,08$ g/dia) (figura 2.2 A e B).

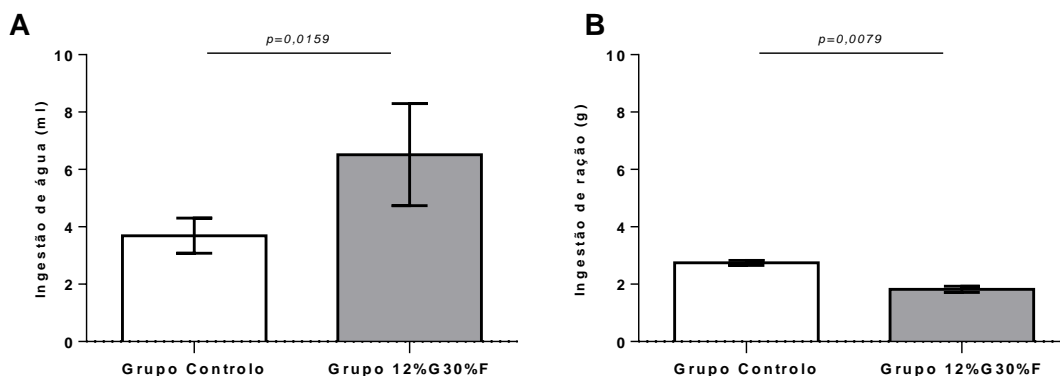


Figura 2.2. Ingestão diária de água e ração por murganho durante as seis semanas de exposição, *ad libitum*, à dieta 12%G30%F. Estimativa da ingestão diária média de água de bebida (A) e de ração (B) por murganhos *Cd26* KO expostos à dieta 12%G30%F durante seis semanas, em comparação ao grupo controlo. Os resultados são apresentados como média \pm epm após 6 semanas de tratamento. Valores de *p* obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*.

2.3. Ganho de peso e efeitos sistémicos

No fim do tempo de exposição à dieta, verificou-se que os murganhos *Cd26* KO do grupo 12%G30%F não tiveram um ganho de peso corporal superior ($2,70 \pm 0,49$ g/murganho) comparativamente ao grupo de murganhos controlo ($3,10 \pm 0,53$ g/murganho) (figura 2.3 A). Para além disso, a ingestão desta dieta hipercalórica não reduziu a capacidade de regulação do metabolismo glicémico (sendo que a excursão glicémica foi significativamente reduzida neste grupo de murganhos) (figura 2.3 B) nem foi suficiente para induzir alterações sistemáticas ao nível do perfil lipídico comparativamente ao grupo de murganhos controlo (figura 2.3 C).

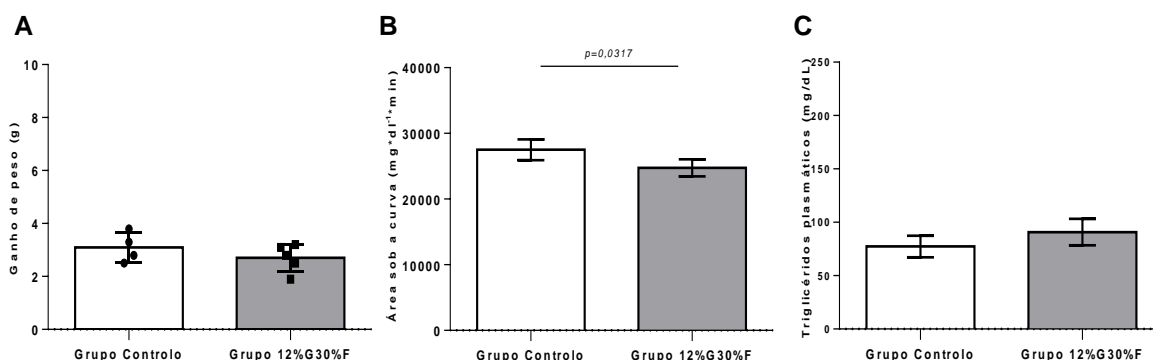


Figura 2.3. Ganho de peso e efeitos sistémicos em murganhos *Cd26* KO expostos, *ad libitum*, à dieta 12%G30%F durante 6 semanas. Ganho de peso, por murganho, ao fim das seis semanas de tratamento (A); área sob a curva dos níveis médios de glicemia, por grupo de murganhos,

durante a PTGO realizada à quinta semana de tratamento (**B**); valores médios de TG plasmáticos, por grupo de murganhos, no fim do tratamento (**C**). Os resultados representados sob a forma de barras correspondem aos valores médios por grupo \pm epm (n=4-5). Valores de *p* obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*.

2.4. Patologia hepática

A avaliação histopatológica do tecido hepático de murganhos *Cd26* KO permitiu concluir que a exposição, durante seis semanas, à dieta hipercalórica suplementada com glicose e frutose na água de bebida não levou ao desenvolvimento de perturbações hepáticas características da NAFLD (*tabela 2.1*). Através do painel de fotomicrografias adquiridas em microscópio óptico (*figura 2.4*) foi possível observar a integridade do parênquima hepático e a ausência de evidências de esteatose e balonização celulares nos murganhos *Cd26* KO expostos à dieta 12%G30%F. Para além disso, não foram registados indícios de fibrose ou pontos hemorrágicos nos lóbulos hepáticos destes murganhos (*tabela 2.1 e figura 2.4*).

Relativamente ao *score* de actividade da NAFLD este foi igual para o grupo de murganhos expostos e não expostos ao regime de 12%G30%F, sugerindo que a ausência da molécula CD26 protege os murganhos do desenvolvimento de lesão hepática da NAFLD.

Tabela 2.1. Classificação histopatológica da lesão hepática em murganhos *Cd26* KO expostos e não expostos à dieta hipercalórica de 12%G30%F durante seis semanas. Critérios para a classificação foram adaptados do “*Histological Scoring System for Nonalcoholic Fatty Liver Disease*” proposto por de Kleiner, *et al.*, (208).

		Grupo Controlo	Grupo 12%G30%F
Esteatose	Grau 0: <5%;	2/4	4/5
	Grau 1: 5-33%	2/4	1/5
	Grau 2: > 34-66%	0/4	0/5
	Grau 3: > 66%	0/4	0/5
	Total de actividade	0,5	0,2
Balonização Celular	Grau 0: ausente	2/4	5/5
	Grau 1: leve/pouca	2/4	0/5
	Grau 2: moderada/acentuada	0/4	0/5
	Total de actividade	0,5	0
Inflamação lobular	Grau 0: ausente	4/4	1/5
	Grau 1: <2focos/20x CO	0/4	4/5
	Grau 2: 2-4 focos/20x CO	0/4	0/5

	Grau 3: > 4 focos/20x CO	0/4	0/5
	Total de actividade	0	0,8
	Score de actividade da NAFLD	1	1
	Grau 0: ausente	4/4	5/5
	Grau 1: fibrose perissinusoidal	0/4	0/5
Fibrose	Grau 2: fibrose perissinusoidal	0/4	0/5
	com fibrose periportal/portal	0/4	0/5
	Grau 3: <i>bridging</i>	0/4	0/5
	Grau 4: cirrose		

*CO: campo óptico

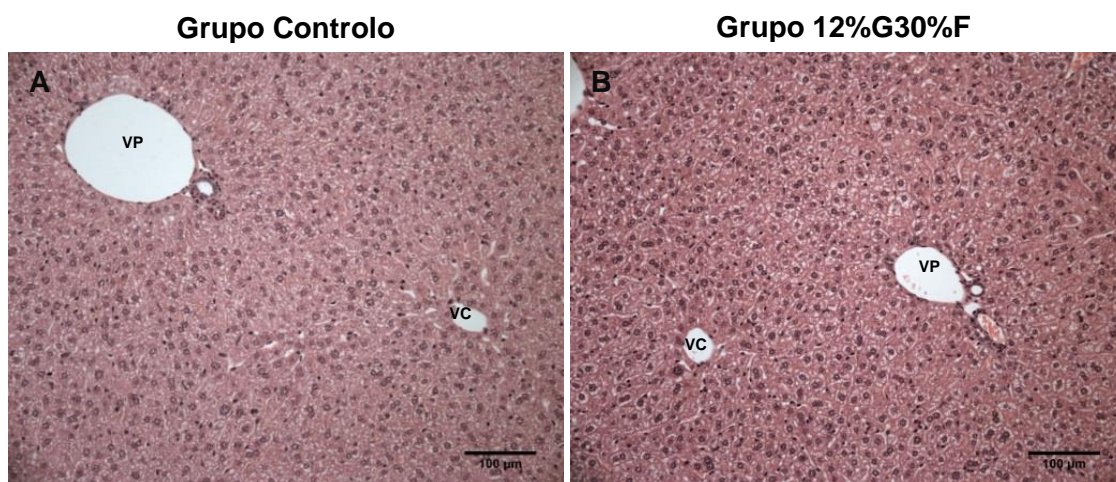


Figura 2.4. Análise histológica da lesão hepática de murganhos *Cd26* KO sujeitos ou não a dieta hipercalórica. Secções histológicas transversais, 3 µm de espessura, de fígado de murganhos controlo (A) e submetidos à dieta de 12%G30%F (B), por coloração com hematoxilina-eosina. Fotomicrografias adquiridas em microscópio óptico *Leica DMLB2*, com ampliação de 200x. VP: veia porta; VC: veia centro-lobular.

2.5. Expressão genética

A ausência de lesão hepática típica da NAFLD nos murganhos *Cd26* KO expostos à dieta 12%G30%F levou ao estudo dos mecanismos genéticos que possam estar inibidos nestes murganhos.

2.5.1. Genes lipogénicos

Por PCR quantitativo em tempo real, avaliaram-se os valores de expressão genética de alguns factores de transcrição e enzimas envolvidos na LDN em tecido hepático total de murganhos *Cd26* KO expostos à dieta de 12%G30%F. Os resultados indicam que a dieta suplementada com HC aumentou a expressão do factor de transcrição *Mlx1p* (ChREBP) e de algumas enzimas da neolipogénese (i.e. SCD1 e DGAT2) em relação aos murganhos do grupo controlo (tabela 2.2). Contudo, a LDN observada não

foi suficiente para induzir esteatose. Estes resultados sugerem que a LDN não será a principal causa de esteatose hepática observada em murganinhos WT do grupo 12%G30%F.

Tabela 2.2. Expressão genética de factores de transcrição enzimas lipogénicas em tecido hepático total de murganinhos Cd26 KO sujeitos ou não à dieta de 12%G30%F. Os valores de *p* foram obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*; grupo 12%G30%F vs grupo controlo.

GENES	Grupo 12%G30%F
<i>Mlxipl</i> (<i>ChREBP</i>)	↑* <i>p</i> =0,0159
<i>Srebf1</i> (<i>SREBP1c</i>)	ns
<i>Acaca</i> (<i>Acc1</i>)	ns
<i>Fasn</i> (<i>FAS</i>)	ns
<i>Scd1</i> (<i>SCD</i>)	↑* <i>p</i> =0,0317
<i>Dgat2</i>	↑* <i>p</i> =0,0317
<i>Cd36</i>	ns

*ns: não difere estatisticamente do grupo controlo

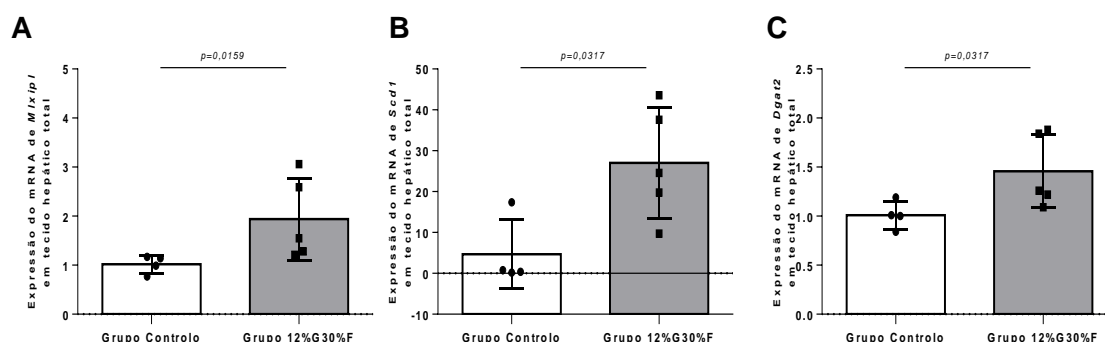


Figura 2.5. Quantificação relativa do mRNA dos genes lipogénicos em tecido hepático total de murganinhos Cd26 KO expostos à dieta 12%G30%F. Representação gráfica da expressão genética dos genes lipogénicos significativamente alterados pela dieta (i.e. *Mlxipl*, *Scd1* e *Dgat2*). Os resultados individuais de PCR em tempo real de cada murganinho (representados por símbolos) foram obtidos pelo método CT Comparativo (Método $2^{-\Delta\Delta C_t}$), normalizados para a expressão de mRNA do respectivo controlo utilizando o gene *Gapdh* como controlo endógeno. As barras representam os valores médios para cada grupo com \pm epm (n=4-5), após exclusão de valores aberrantes. Valores de *p* foram obtidos pelo teste de *Mann-Whitney*.

2.5.2. Genes pró-inflamatórios

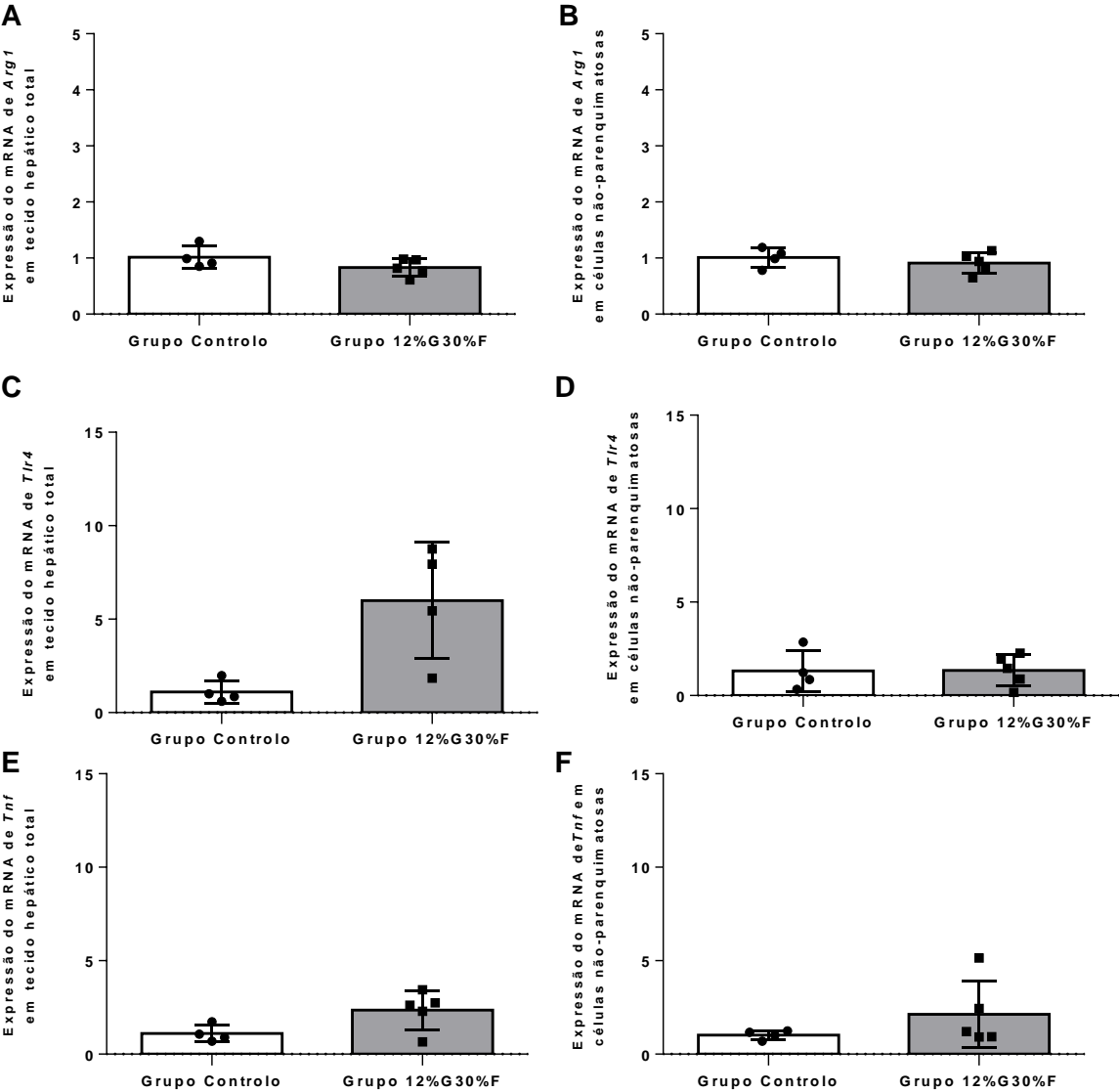
O impacto da depleção do Cd26 na modulação de genes envolvidos na inflamação após exposição à dieta 12%G30%F foi igualmente analisado em tecido hepático total e em NPC, por PCR quantitativo em tempo real. Verificou-se que nas NPC a expressão da maior parte dos genes analisados não foi diferente entre os grupos 12%G30%F e grupo controlo (tabela 2.3). De salientar que após a exposição à dieta hipercalórica, a ausência do CD26 reduziu significativamente o desenvolvimento do perfil de ativação pro-inflamatório das NPC observado nos murganinhos WT, cancelando o aumento de expressão genética do *Tlr4*, *Tnf* e da *Il1b* e a diminuição da *Arg1* (figura 2.6 D, F, H e B). Estes resultados sugerem que o gene *Cd26* tem um papel crítico na resposta pro-

inflamatória das KC nos murganhos WT, que desenvolvem a NAFLD quando expostos à dieta 12%G30%F (figura 1.6 D, F e H).

Tabela 2.3. Expressão de genes envolvidos no processo inflamatório em murganhos Cd26 KO sujeitos ou não a água de bebida suplementada com 12%G30%F. Os valores de *p*-foram obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*, testando o Grupo controle vs Grupo 12%G30%F.

GENES	Grupo 12%G30%F	
	Tecido hepático	Células
	total	não-parenquimatosas
<i>Emr1 (F4/80)</i>	↑* <i>p</i> =0,0159	↑* <i>p</i> =0,0159
<i>Arg1</i>	ns	ns
<i>Nos2/iNOS</i>	↑* <i>p</i> =0,0357	↑* <i>p</i> =0,0286
<i>Tlr4</i>	ns	ns
<i>Myd88</i>	↑* <i>p</i> =0,0317	ns
<i>Il1b</i>	ns	ns
<i>Tnf (Tnfa)</i>	ns	ns
<i>Hmgb1</i>	ns	-

*ns: não difere estatisticamente do grupo controle



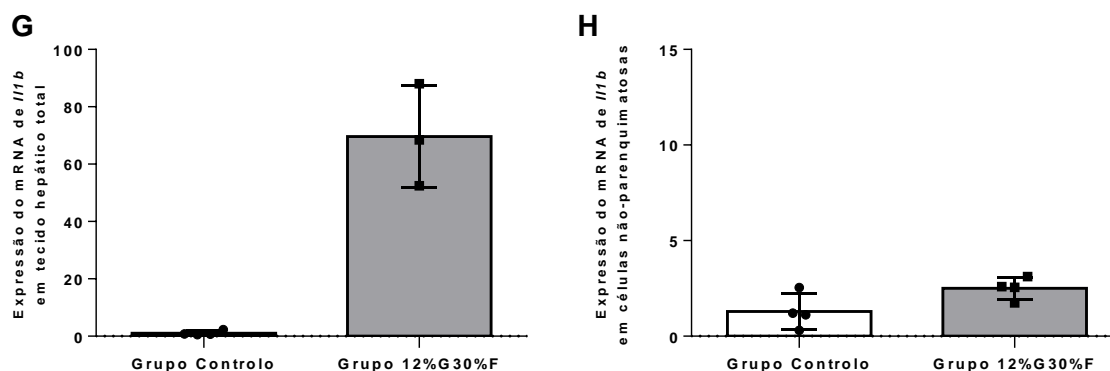


Figura 2.6. Quantificação relativa do mRNA de genes pro-inflamatórios em tecido hepático total e em células não-parenquimatosas de murganhos *Cd26* KO expostos à dieta 12%G30%F. Expressão genética da *Arg1* (A e B), *Tlr4* (C e D), *Tnf* (E e F) e *Il1b* (G e H) por PCR quantitativo em tempo real. Os resultados individuais de cada murganho (representados por símbolos), foram obtidos pelo método CT Comparativo (Método $2^{-\Delta\Delta C_t}$), normalizados para a expressão do mRNA do respectivo controlo utilizando o gene *Gapdh* como controlo endógeno. As barras representam os valores médios para cada grupo com \pm epm (n=4-5), após exclusão de valores aberrantes. Valores de *p* foram obtidos pelo teste de *Mann-Whitney*.

2.5.3. Genes pró-fibróticos

Relativamente à expressão de genes envolvidos no processo fibrótico, verificou-se que os murganhos *Cd26* KO expostos a dieta suplementada com glicose e frutose durante as seis semanas, não apresentaram aumento da expressão de genes pró-fibróticos testados comparativamente ao grupo de murganho controlo não exposto à dieta (tabela 2.4), contrariamente ao que se observou nos murganhos WT expostos às mesmas condições (tabela 1.4). Este resultado sugere que a ausência da molécula CD26 também protege os murganhos da indução de uma resposta pró-fibrótica deixando em aberto possibilidade de que esta resposta seja cancelada na ausência de mecanismos inflamatórios que levam à esteatose.

Tabela 2.4. Expressão de genes envolvidos no processo fibrótico em murganhos *Cd26* KO sujeitos ou não a água de bebida suplementada com 12%G30%F. Os valores de *p*- foram obtidos pelo teste estatístico de *Mann-Whitney*, testando o Grupo controlo vs Grupo 12%G30%F.

GENES	Grupo 12%G30%F	
	Tecido hepático total	Células não-parenquimatosas
<i>Tgfb1</i>	Ns	ns
<i>Fn1</i>	↑* <i>p</i> =0,0159	ns
<i>Pdgfb</i>	Ns	ns

*ns: não difere estatisticamente do grupo controlo

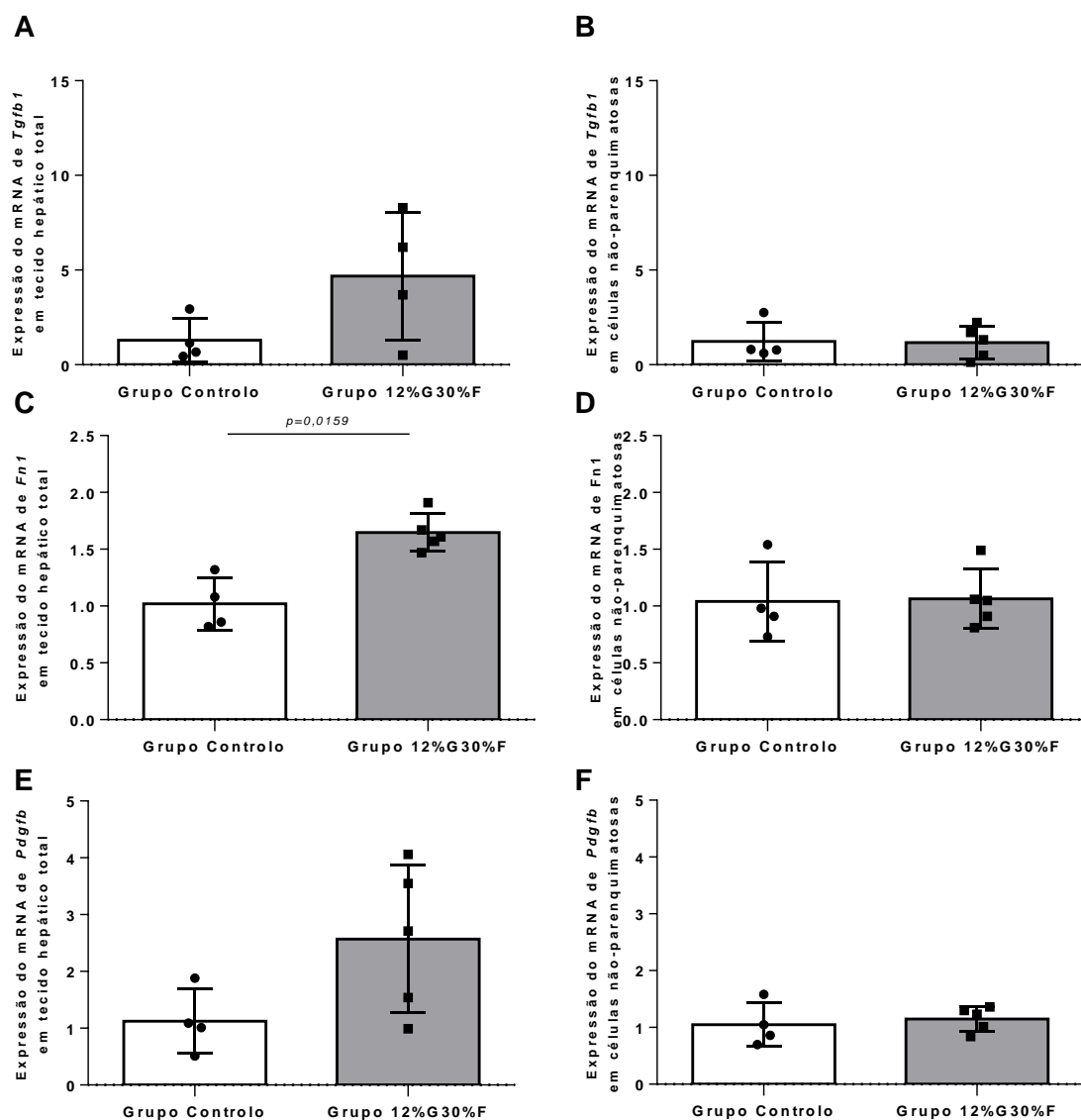


Figura 2.7. Quantificação relativa do mRNA de genes pro-fibróticos em tecido hepático total e em células não-parenquimatosas de murganhos *Cd26* KO expostos à dieta 12%G30%F. Expressão genética de *Tgfb1* (A e B), *Fn1* (C e D), *Pdgfb* (E e F) por PCR quantitativo em tempo real. Os resultados individuais de cada murganho (representados por símbolos) foram obtidos pelo método CT Comparativo (Método $2^{-\Delta\Delta C_t}$), normalizados para a expressão do mRNA do respectivo controle utilizando o gene *Gapdh* como controle endógeno. As barras representam os valores médios para cada grupo com \pm epm (n=4-5). Valores de *p* foram obtidos pelo teste de *Mann-Whitney*.

3. O papel do CD26 na activação das células de *Kupffer*

O aumento da expressão genética do *Cd26* nas NPC de murganhos com evidências hepáticas da NAFLD e a atenuação das respostas pró-inflamatórias e pró-fibróticas nas NPC de murganhos *Cd26* KO expostos a dieta rica em HC, sugerem que esta molécula pode estar envolvida na imunopatogénese da NAFLD mediada pelas KC. Deste modo investigou-se a contribuição do CD26 na activação das KC.

Para isso, compararam-se duas populações distintas de macrófagos isoladas de murganhos C57BL/6 (WT): uma população enriquecida em KC proveniente do isolamento e purificação de NPC e uma população de macrófagos convencionais isolada da cavidade peritoneal (MacPercav). Procedeu-se à estimulação *in vitro* de culturas primárias destas populações celulares por uma endotoxina (LPS e/ou por um ácido gordo saturado (ácido palmítico (AP)). Por fim, quantificou-se a actividade enzimática de peptidase do CD26 e a produção de mediadores de inflamação (i.e. de TNF- α e IL-10) presentes no sobrenadante de cultura, de acordo com o procedimento descrito em Materiais e Métodos (figura 5).

3.1. Actividade enzimática do CD26

Após estimulação, *in vitro*, das duas populações de macrófagos quantificou-se a actividade DPP-IV do CD26 no sobrenadante de cultura, por ensaio fluorométrico. Verificou-se que, face aos diferentes estímulos utilizados, a actividade péptidásica do CD26 foi superior no sobrenadante de cultura das KC, comparativamente à observada nos MacPercav (figura 3.1). Observou-se também que a combinação de LPS 0,01 μ g/ml com AP 400 μ M correspondeu ao estímulo que induziu maior actividade peptidásica nas KC não sendo suficiente para aumentar a actividade desta enzima nos MacPercav. Estes resultados sugerem que as KC possuem um perfil de expressão de *Cd26* diferente dos macrófagos convencionais.

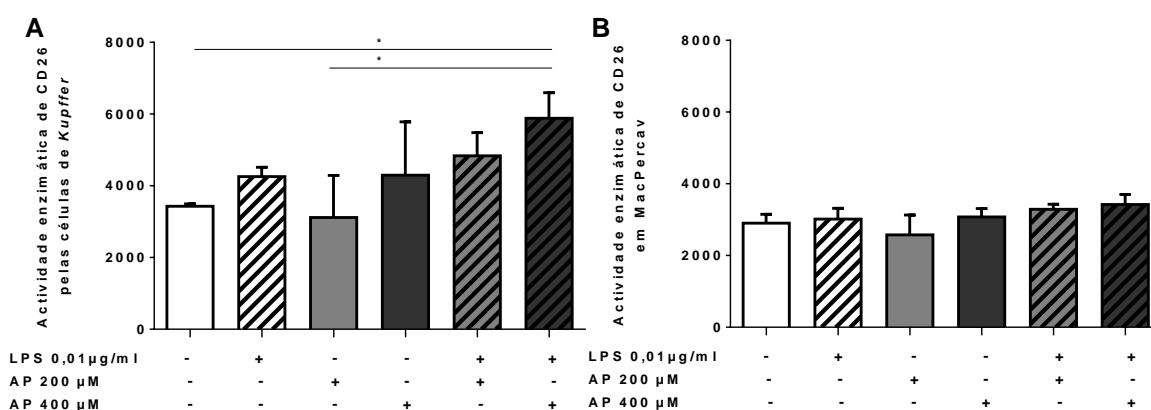


Figura 3.1. Actividade enzimática do CD26 no sobrenadante de cultura de células de Kupffer e macrófagos da cavidade peritoneal de murganhos WT após estimulação, *in vitro*. Ensaio fluorométrico para quantificação da actividade de DPP-IV no sobrenadante de cultura de KC (A) e MacPercav (B) após estimulação. As barras representam os valores médios para cada grupo com \pm epm (n=3). Valores de *p* foram obtidos pelo teste de Tukey (ANOVA). * $p \leq 0,05$

3.2. Produção de mediadores inflamatórios

3.2.1. Factor de necrose tumoral- α (TNF- α)

O impacto do CD26 na produção do TNF- α pelas KC foi avaliado em murganhos WT e *Cd26* KO e comparada com populações de MacPercav isoladas dos mesmos animais. Deste modo, quantificou-se a produção desta citocina presente no sobrenadante de cultura destas células através de um ensaio de *ELISA sandwich*.

Observou-se que, perante os diferentes estímulos seleccionados, as KC apresentaram uma resposta de TNF- α muito inferior à dos MacPercav. Por exemplo, face ao estímulo de activação clássico de macrófagos, o LPS, a produção de TNF- α pela população celular enriquecida em KC foi cerca de cinco vezes inferior comparativamente à produzida pelos MacPercav (*figura 3.2 A e B*). O tratamento, *in vitro*, com AP (200 e 400 μ M), não promoveu a activação de nenhuma das populações de macrófagos testados, sugerindo este estímulo lipídico *per se* não influencia a resposta inflamatória. Todavia, a combinação de LPS 0,01 μ g/ml com AP a diferentes concentrações teve um efeito antagonista nas KC, inibindo a resposta de TNF- α obtida pela estimulação por LPS. Para caracterizar o efeito da ausência da molécula CD26 na activação dos macrófagos e na consequente resposta pró-inflamatória, foram isolados e estimuladas *in vitro*, populações de MacPercav e KC de murganhos fêmeas com depleção genética desta enzima. Observou-se que as KC com depleção do *Cd26* apresentaram menor produção de TNF- α face aos diferentes estímulos, sugerindo que o CD26 é uma molécula que regula parcialmente a resposta do TNF- α e a activação das KC (*figura 3.3 C*).

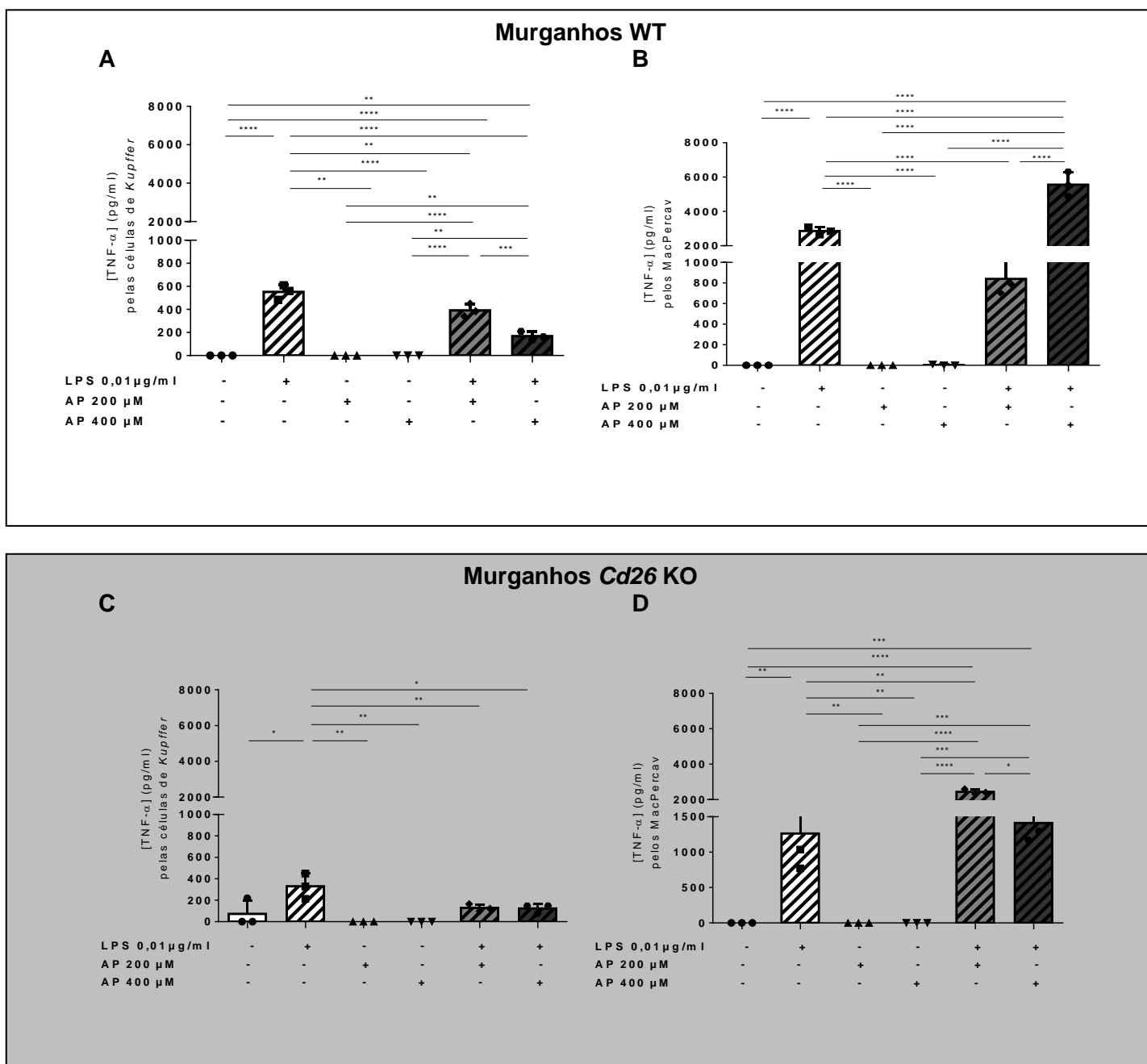


Figura 3.2. Produção de TNF- α pelas células de *Kupffer* e por macrófagos da cavidade peritoneal, de murganços WT e *Cd26* KO, após estimulação, *in vitro*, por diferentes compostos. Quantificação, por *ELISA sandwich*, da concentração de TNF- α presente no sobrenadante de cultura de KC (A e C) e de MacPercav (B e D) após estimulação. As células apresentadas em (A e B) e (C e D) foram isoladas e purificadas de murganços WT e *Cd26* KO, respectivamente. As barras representam os valores médios \pm epm (n=3). Valores de *p* foram obtidos pelo teste de Tukey (ANOVA), **p*≤0,05; ***p*≤0,01; ****p*≤0,001; *****p*≤0,0001

3.2.2. Interleucina-10 (IL-10)

Por último, quantificou-se a citocina IL-10 presente no sobrenadante de cultura das KC e MacPercav após os estímulos anteriores. Verificou-se que as KC apresentaram uma produção de IL-10 superior comparativamente aos MacPercav (figura 3.3 A e B), em concordância com a natureza tolerogénica das KC. Por exemplo, após seis horas

de estimulação com a endotoxina bacteriana a produção da IL-10 pelas KC foi cerca de 14 vezes superior comparativamente à dos MacPercav. Em contraste, a estimulação com AP não levou à produção da IL-10 por nenhuma das populações de macrófagos estudadas, sugerindo este estímulo lipídico não teve influência na resposta anti-inflamatória. No entanto, a combinação de AP 200/400 μ M e LPS, inibiu o efeito do segundo estímulo na produção da IL-10 pelas KC. O papel da ausência da molécula CD26 na resposta anti-inflamatória, foi testado em culturas primárias de MacPercav e KC isoladas de murganhos *Cd26* KO. No seu conjunto, os diferentes estímulos não induziram a produção da IL-10 nas KC de murganhos KO comparativamente às mesmas células isoladas murganhos WT. Apenas perante o estímulo com LPS 0,01 μ g/ml houve produção de IL-10 pelas KC, sendo muito inferior comparativamente às KC de murganhos WT.

No seu conjunto estes dados sugerem que a molécula CD26 tem um papel preponderante na activação das KC em resposta a estímulos inflamatórios.

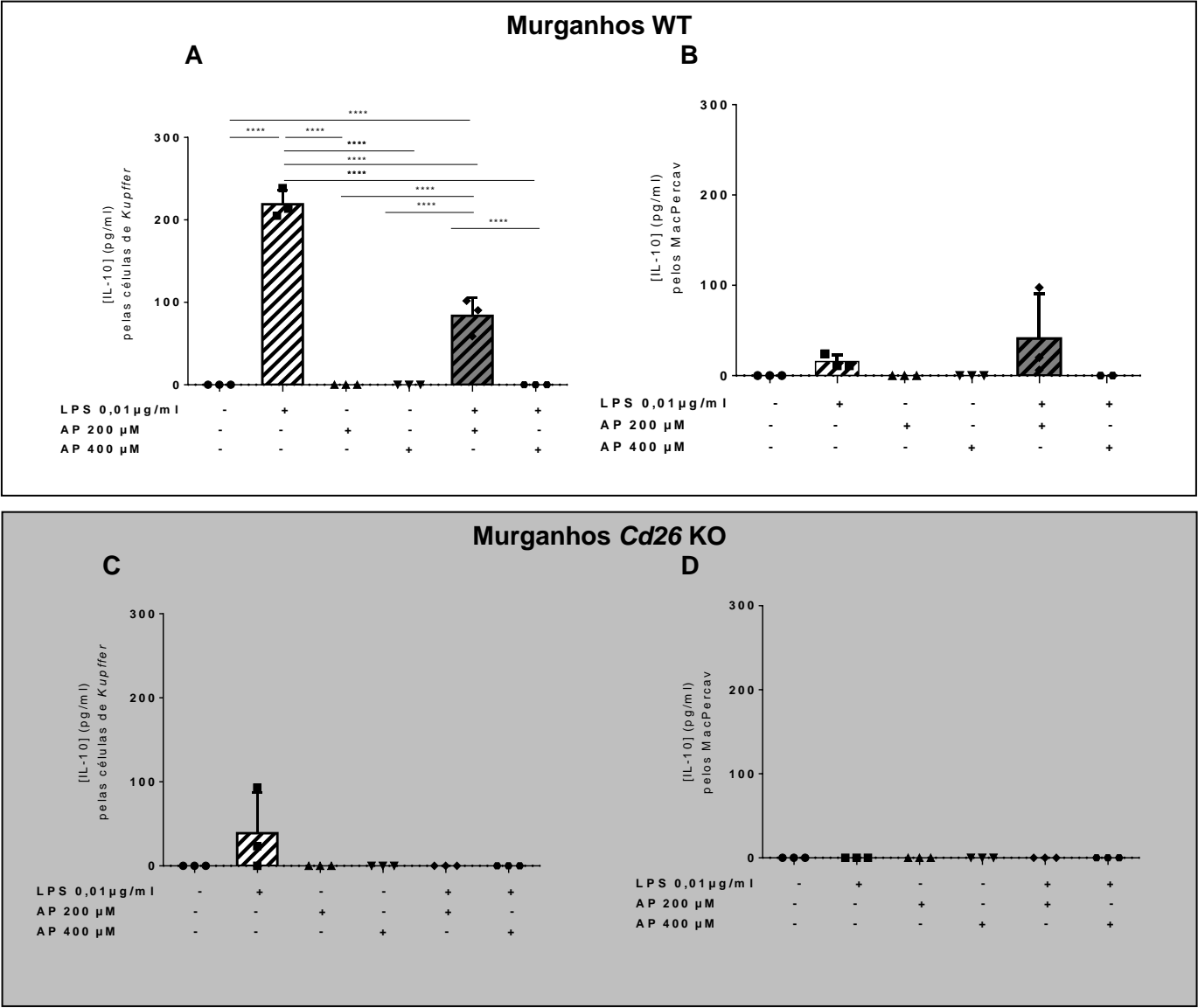


Figura 3.3. Produção de IL-10 pelas células de Kupffer e por macrófagos da cavidade peritoneal e, de murganhos WT e Cd26 KO, após estimulação, *in vitro*, por diferentes compostos. Quantificação, por ensaio de *ELISA sandwich*, da concentração de IL-10 presente nos sobrenadantes de cultura de KC (**A** e **C**) e de MacPercav (**B** e **D**) após estimulação *in vitro*. As células apresentadas em (**A** e **B**) e (**C** e **D**) foram isoladas e purificadas de murganhos WT e Cd26 KO, respectivamente. As barras representam os valores médios \pm epm (n=3). Valores de *p* foram obtidos pelo teste de Tukey (ANOVA), * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

V. DISCUSSÃO

1. Caracterização de modelos da NAFLD induzidos por dietas hipercalóricas

A NAFLD é uma patologia multifactorial que advém da acção combinada de factores genéticos e metabólicos, perante um quadro de inflamação crónica. Sabe-se que a maior parte dos pacientes com a NAFLD têm/tiveram uma ingestão calórica diária excessiva. Contudo, a contribuição de diferentes combinações hipercalóricas na fisiopatologia desta doença ainda não está totalmente esclarecida (210). Esta tese caracteriza os efeitos precoces na desregulação do metabolismo sistémico, na indução da patologia típica da NAFLD e na activação da resposta inflamatória, fibrótica e lipogénica no fígado de murganhos provocadas pela exposição a duas dietas hipercalóricas: suplementação de glicose 12% (m/v) e frutose 30% (m/v) na água de bebida ou ração tipo *Western* (42% lípidos, 43% HC (dos quais 34% sacarose) e 15% proteínas).

Os resultados indicam que a combinação de monómeros de glicose e frutose na água de bebida assim como a composição nutricional da dieta tipo *Western*, rica em açúcares e lípidos saturados, favoreceram a ingestão diária destas dietas comparativamente à do grupo de murganhos controlo (*figura 1.1*). Possivelmente, as propriedades hedónicas, isto é a “palatabilidade” destes alimentos activaram mecanismos neurobiológicos que contribuíram para a hiperfagia reflectindo-se num ganho de peso mais acentuado relativamente ao grupo de murganhos controlo. De facto, Gabriela Ribeiro, Osvaldo Santos e Daniel Sampaio, entre outros autores sugerem que mesmo perante condições em que as necessidades energéticas já foram satisfeitas, a palatabilidade da comida é capaz de governar o comportamento alimentar, estando descritos mecanismos celulares e moleculares (por exemplo, neurotransmissores e circuitos de recompensa cerebrais) comuns à compulsão alimentar, obesidade e dependência de drogas (211,212).

Para além do ganho de peso, os efeitos sistémicos provocados pela exposição a estas duas dietas hipercalóricas foram mais discretos (*figura 1.2*). Mais especificamente, à quinta semana de tratamento, apenas o grupo de murganhos exposto à dieta tipo *Western* revelou menor capacidade no controlo glicémico face a um estímulo oral de glicose (prova PTGO) comparativamente ao grupo controlo, sendo que nenhum dos regimes hipercalóricos foi suficiente para provocar dislipidémia pós-prandial. Factores intrínsecos ao nosso estudo podem justificar a relativa discrepância entre os nossos resultados e os de outros estudos que relatam alterações periféricas acentuadas após exposição a dietas hipercalóricas semelhantes, sendo provavelmente os mais

relevantes: (i) o género dos murganhos do nosso estudo. Contrariamente à grande maioria dos estudos, as fêmeas revelaram-se menos susceptíveis aos efeitos sistémicos da dieta, sugerindo uma possível protecção hormonal através dos estrogénios (213–215); (ii) a idade dos murganhos do nosso estudo. Murganhos com 5-6 semanas de idade são biológica e metabolicamente mais activos que animais mais velhos frequentemente utilizados neste tipo de estudos e (iii) a duração do tratamento (98,216,217), já que foi escolhida uma exposição curta para evidenciar sinais precoces.

A ausência de efeitos sistémicos significativos, mas a presença de alterações a nível hepático após exposição às duas dietas hipercalóricas, permitiu focar a análise nos estadios iniciais do processo patogénico.

Histologicamente, foram encontradas perturbações hepáticas iniciais características da NAFLD como esteatose macro- e microvesicular de grau 1 ou 2, distribuída principalmente na zona 1 do ácino (zona peri-portal), balonização celular (só no grupo exposto à dieta tipo *Western*), sem eventos de inflamação lobular/infiltração celular e fibrose comparativamente ao grupo de murganhos controlo (*tabela 1.1 e figura 1.4*).

Apesar das duas combinações hipercalóricas terem levado ao aparecimento de esteatose hepática, os mecanismos que contribuíram para a acumulação de lípidos no interior dos hepatócitos parecem ter sido diferentes. De facto, apenas a exposição à dieta tipo *Western*, rica em sacarose e lípidos, intensificou a síntese endógena de TG e potenciou o importe de lípidos desta dieta para os hepatócitos, resultando em esteatose e balonização hepáticas. Contrariamente, a suplementação com monómeros de glicose e frutose na água de bebida não aumentou a expressão genética dos factores de transcrição (SREBP-1c e ChREBP) nem das principais enzimas (ACC1, FAS, SCD1 e DGAT2) envolvidas na LDN (*tabela 1.2*), contrariando também algumas evidências da literatura (75), o que sugere a existência de outros mecanismos que poderão ter levado ao desenvolvimento de esteatose hepática neste regime.

Curiosamente e contrariamente ao que seria de esperar a exposição à dieta tipo *Western* diminuiu os níveis do mRNA da *Scd1* comparativamente aos animais do grupo controlo (*figura 1.5 C*). Uma vez que a SCD1 é uma enzima-limitante na LDN e que a sua depleção genética foi suficiente para proteger os murganhos do desenvolvimento de esteatose e obesidade, após 23 semanas de exposição a um regime hiperlipídico (218), seria de esperar que os murganhos expostos à dieta tipo *Western* do nosso estudo apresentassem um aumento da expressão genética desta enzima. Deste modo, este resultado corrobora a necessidade de se ter em consideração a existência de mecanismos de repressão da expressão genética por

feedback negativo e a existência de múltiplas isoformas enzimáticas codificadas por outros genes homólogos na análise deste tipo de resultados.

O impacto das duas dietas hipercalóricas na modulação da expressão de genes envolvidos no processo pró-inflamatório foi analisado em preparações de NPC e em tecido hepático total. No seu conjunto a expressão dos genes analisados estava significativamente aumentada nos murganhos expostos à dieta enriquecida em glicose e frutose, enquanto que a exposição à dieta tipo *Western* não induziu um perfil de resposta inflamatória (*tabela 1.3*).

O gene *Emr-1* (*EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1*) codifica um marcador celular de macrófagos murinos denominado - F4/80 (219,220) - que é responsável por mecanismos de adesão celular e medeia a sinalização de diferentes vias que contribuem para o desenvolvimento, distribuição e função dos macrófagos *in vivo* (221), tendo um papel na modulação da resposta pró-inflamatória dos macrófagos. Alguns estudos têm associado o contexto pró-inflamatório da NAFLD à expressão desta molécula. Tang *et al.*, demonstraram, por ensaios de imuno-histoquímica, que a exposição a dieta hiperlipídica (59% kcals provenientes de lípidos), durante 12 e 16 semanas, duplicou o número de células F4/80⁺ em fígado de murganhos (161). Apesar de no nosso estudo nenhuma das dietas hipercalóricas ter promovido a proliferação hepática de macrófagos F4/80⁺ (*figura 1.8*) a exposição ao regime suplementado com glicose e frutose induziu o aumento dos níveis do mRNA do *Emr-1* (*figura 1.6 A e B*). Estes resultados sugerem que a exposição a monossacáridos pode actuar com factor de activação/maturação nas KC.

A literatura descreve que a presença de produtos microbianos e/ou citocinas pro-inflamatórias (i.e. LPS e/ou IFN- γ ou TNF- α) no microambiente levam à activação clássica de macrófagos, resultando na polarização para o perfil M1 caracterizado por uma elevada capacidade em apresentar antígenos (via MHC II) a células T e em produzir TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, óxido nítrico, ROS, entre outros (156–158). De facto, a exposição a água de bebida suplementada com glicose e frutose promoveu alterações no perfil de activação das NPC que se evidenciaram pelo aumento da expressão genética da *Nos2* e a concomitante inibição da expressão genética da *Arg1* (*tabela 1.3*), sugerindo a adopção do perfil pró-inflamatório (M1) pelas KC.

A frutose presente nesta dieta poderá ter sido o elemento chave na activação da resposta pro-inflamatória das KC, nomeadamente, através do fenómeno conhecido como “endotoxémia metabólica” (222). Segundo Spruss *et al.*, a patogénese da NAFLD em murganhos expostos a frutose está associada a um excessivo crescimento bacteriano no intestino e à disrupção da permeabilidade selectiva da mucosa intestinal que leva à translocação portal de endotoxinas responsáveis por activar as KC (98).

Nesta linha, Bergheim *et al.*, demonstraram que a ingestão concomitante de frutose e antibióticos (Neomicina e Polimixina B) melhorou a patologia hepática da NAFLD em murganhos (145). Mais ainda, modelos experimentais para esta patologia apresentaram elevados níveis plasmáticos de LPS e sensibilidade hepática aumentada para esta endotoxina (59,61). De facto, o fígado é um órgão alvo da endotoxémia. Cerca de 20-30 minutos após ter sido administrado LPS, intravenosamente, a coelhos, cerca de 80% destas moléculas foram detectadas no fígado destes animais (223). O LPS, componente da membrana celular das bactérias gram-negativas, é descrito como um dos principais PAMPs envolvido na patogénese da NAFLD. De facto, murganhos alimentados com ração *standard* para roedores (*low-fat diet*) sujeitos a infusões subcutâneas contínuas deste PAMP de baixa dose, desenvolveram esteatose e resistência hepática à insulina características da NAFLD (222).

O LPS é reconhecido por macrófagos através de diferentes PRRs, entre eles o TLR4. De acordo com Rivera e co-autores níveis elevados de endotoxémia correlacionam-se com o aumento da expressão genética do *Tlr4* em modelos experimentais da NAFLD e NASH (141). Para além disso, a depleção genética deste PRR atenuou o desenvolvimento de esteatose, inflamação e fibrose hepática (98,141), sugerindo que este é um componente crítico na patogenia da NAFLD. Deste modo, o aumento da expressão genética do *Tlr4* nas NPC dos murganhos expostos à dieta de 12%G30%F comparativamente aos murganhos do grupo controlo (*figura 1.6 F*), sugere o reconhecimento de patogénios pelo TLR4 como um mecanismo activador da resposta imunológica das KC.

Para além disso, a exposição a este regime hipercalórico aumentou os níveis de mRNA do *Myd88* nestas células comparativamente ao grupo de murganhos controlo (*tabela 1.3*) sugerindo que, neste regime, a activação da cascata de sinalização de TLR4 atua através da molécula adaptadora - MyD88. Resultados semelhantes foram obtidos no estudo de Spruss *et al.* (98).

Segundo a literatura, a via de sinalização do TLR4 dependente do MyD88 leva à produção de dois factores (i.e NF- κ B ou AP-1), que controlam a expressão de uma série de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12), quimiocinas, entre outros mediadores inflamatórios nas células do sistema imune (149,150).

Nesta linha, é possível admitir que a sinalização LPS-TLR4-MyD88 foi responsável pelo aumento da expressão genética da *Il1b* nas NPC de murganhos expostos a esta dieta (*figura 1.6 H*). No contexto da NAFLD, Stienstra e colaboradores descreveram que a produção desta citocina pelas KC inibe a actividade hepática do PPAR- α na oxidação- β de ácidos gordos levando ao desenvolvimento de esteatose hepática

(224). Uma vez que a dieta suplementada com glicose e frutose não intensificou a via da LDN, a produção de IL-1 β pelas KC pode ter sido um dos mecanismos responsáveis pela acumulação lipídica observada em cortes histológicos de fígado dos animais expostos a este regime (*figura 1.4 C e D*).

Para além da IL-1 β a dieta 12%G30%F levou ao aumento da expressão genética do *Tnfa* em tecido hepático total e em NPC (*tabela 1.3*), corroborando a activação da via de sinalização do TLR4 dependente do MyD88. Resultados semelhantes foram obtidos por Spruss e colaboradores (98), por Takaoka *et al.*, (225) e também por Tsai e co-autores, que utilizaram modelos experimentais de hamsters (226).

O TNF- α , importante factor de risco para a NAFLD (227), é uma citocina pleiotrópica capaz de induzir diferentes respostas celulares como a proliferação e morte celular dos hepatócitos, a produção de outros mediadores pro-inflamatórios, contribuindo indirectamente para a resistência hepática à insulina e acumulação de lípidos no parênquima (228). No nosso estudo, a acção do TNF- α secretado pelas KC poderá estar relacionada com a indução da expressão genética da proteína do grupo 1 de elevada mobilidade (HMGB1) nos hepatócitos, sugerindo o *stress* celular nestas células após a exposição à dieta 12%G30%F. De facto, HMGB1, é uma proteína nuclear que facilita a transcrição do DNA, sendo libertada em condições de *stress* por células em necrose, desencadeando uma diversidade de respostas que vão desde a estimulação da produção de citocinas, a quimiotaxia, a angiogénese, à diferenciação e proliferação celulares (229).

Em contraste, a ingestão da dieta tipo *Western* não teve impacto na modulação da expressão de genes envolvidos no processo pro-inflamatório à excepção do gene *Arg1* (*tabela 1.3*). A diminuição dos níveis de mRNA da *Arg1* comparativamente ao grupo de murganhos controlo, sugere que as KC destes animais possam estar a detectar alterações no micro-ambiente hepático e a iniciar uma resposta de activação celular secundária. De facto, evidências sugerem que o teor e/ou composição hepática de lípidos é capaz de modular, directa ou indirectamente, a actividade biológica das KC (163,165,166).

Para além do processo inflamatório da NAFLD, o impacto das duas dietas hipercalóricas na modulação da expressão de genes envolvidos no processo fibrótico foi também analisado em preparações de NPC e em tecido hepático total.

O primeiro gene analisado, *Tgfb1*, codifica a principal citocina fibrogénica envolvida directamente na trans-diferenciação das HSC em miofibroblastos, responsáveis pela produção de proteínas da matriz extracelular. De acordo com a literatura, o transporte portal de endotoxinas promove a sinalização do eixo TLR4-MyD88-NF- κ B nas HSC levando à secreção e activação autócrina por TGF- β 1 (148). Por outro lado, evidências

descrevem que as KC activadas produzem esta citocina modulando a activação das HSC através deste factor (172). No nosso estudo, os níveis de mRNA do *Tgfb1* nas NPC de murganhos expostos à dieta 12%G30%F estavam aumentados comparativamente às mesmas células de animais controlo (*figura 1.7 B*), sugerindo que o contexto pro-inflamatório criado por este regime poderá estar associado a estadios iniciais de activação autócrina e/ou parácrina das HSC.

Como resultado da activação das HSC estas podem trans-diferenciar-se em miofibroblastos, células especializadas na produção de fibras colagénio tipo I e III, glicoproteínas (por exemplo, FN1) entre outros, levando à remodelação da matriz extracelular (170). O contexto de inflamação crónica provocada pela ingestão da dieta 12%G30%F foi responsável por aumentar a expressão genética da *Fn1* (*figura 1.7 C*) suportando a hipótese da estimulação de uma reacção fibrótica. Para além disso, o regime 12%G30%F aumentou os níveis de mRNA do *Pdgfb* (*figura 1.7 F*) estando este factor associado à proliferação e/ou quimiotaxia das HSC na resposta fibrótica. Apesar de não terem sido encontradas evidências histológicas de fibrose hepática (*figura 1.4 C e D*), o ambiente pro-inflamatório criado pela exposição a água de bebida suplementada com glicose e frutose durante seis semanas foi suficiente para modular a expressão de alguns genes que podem predispor ao aparecimento de fibrose se a exposição à dieta for prolongada. A exposição à dieta tipo *Western* também aumentou a expressão do *Tgfb1* e do *Pdgfb* nas NPC comparativamente a murganhos controlo (*figura 1.7 B e F*). Contudo, a ausência de um microambiente pro-inflamatório no fígado e o fenótipo anti-inflamatório das KC neste regime, sugerem que nestes animais esta resposta de reparação do parênquima não seja acompanhada pela reacção fibrogénica.

2. Contribuição da molécula CD26 na imunopatogénese da NAFLD

O CD26 é uma glicoproteína que se pode encontrar sob a forma solúvel (sCD26) em diferentes fluídos corporais ou ancorada à membrana plasmática de uma variedade de células, incluindo células endoteliais, epiteliais e do sistema imune (196). A região catalítica do CD26 apresenta actividade enzimática de DPP-IV tendo uma diversidade de substratos naturais, como citocinas, quimiocinas, factores de crescimento, neuropeptídeos e outras hormonas, o que ilustra a amplitude da actividade biológica do CD26 (196,198). Realça-se o papel do sCD26/DPP-IV na modulação do sistema incretínico que leva à utilização clínica de inibidores farmacológicos de DPP-IV e/ou à administração de incretinomiméticos, (isto é péptidos análogos às hormonas incretinas mas resistentes a esta enzima), como estratégias terapêuticas insulínogénicas na DM2 e na síndrome metabólica (230–232).

Para além destas disfunções metabólicas, alterações nos níveis sorológicos de sCD26/DPP-IV têm vindo a ser associadas à etiologia de doenças auto-imunes, cardiovasculares, cancerígenas, infecciosas e, mais recentemente, de patologias hepáticas (233–235). Nesta linha, resultados preliminares não publicados do nosso laboratório sugerem que o aumento da actividade enzimática do CD26 está associado a estados da NAFLD em indivíduos pré-diabéticos. Também Balaban YH e colaboradores correlacionaram o aumento de sCD26/DPP-IV no soro e o aumento da expressão genética hepática desta molécula com o grau de lesão do fígado em pacientes com NASH (236).

Este trabalho revela que os níveis de mRNA do *Cd26* estavam aumentados nas NPC de murganhos expostos à dieta 12%G30%F, quando a histo-patologia é ainda ligeira e os efeitos sistémicos pouco pronunciados. Este resultado motivou o estudo da contribuição do CD26 na imunopatogénese da NAFLD em murganhos *Cd26* KO expostos ao regime 12%G30%F tendo-se observado que estes murganhos não tiveram um ganho de peso corporal superior em relação aos murganhos CD26 KO não expostos à dieta, contrariamente ao que foi observado em murganhos WT. Para além disso, murganhos CD26 KO expostos ao regime 12%G30%F tiveram melhorias na metabolização geral da glicose, não apresentando marcadores de dislipidémia pós-prandial em relação aos animais não expostos. É possível que estes resultados se devam à ausência da sCD26/DPP-IV. De acordo com Didier Marguet *et al.*, murganhos CD26 KO apresentam níveis sorológicos de GLP-1 elevados, o que se traduz num aumento da insulinémia e da tolerância à glicose, comparativamente aos murganhos WT (206). De facto, sCD26/DPP-IV é capaz de degradar hormonas incretinas, entre os

quais, os peptídeos GLP-1 e GLP-2 e o peptídeo insulínotropo dependente de glicose (GIP). Mais especificamente, o GLP-1, é secretado por células enteroendócrinas em resposta à ingestão de glicose, controlando a homeostasia deste HC no estado pós-prandial através da estimulação da síntese e secreção de insulina e da inibição da produção de glucagon. Assim, é possível admitir que perante a dieta enriquecida em glicose, do nosso estudo, haja um aumento da produção/secreção GLP-1, que na ausência de inibidores naturais, se reflectia num aumento da produção de insulina capaz de melhorar a performance na PTGO comparativamente ao grupo de murganhos expostos a dieta normal.

Investigou-se também o impacto da exposição à dieta 12%G30%F na activação da resposta lipogénica/inflamatória/fibrótica e, consequente, indução de patologia típica da NAFLD em murganhos *Cd26* KO. Verificou-se que a exposição a este regime hipercalórico modulou a expressão hepática de alguns genes (*Mlxipl/Chrebp*, *Scd1* e *Dgat2*) envolvidos na LDN comparativamente aos murganhos do grupo controlo. Contudo, este resultado não se traduziu no desenvolvimento de esteatose ou balonização hepatocelulares, sugerindo que neste regime a ausência do CD26 atenua outros mecanismos patogénicos críticos para o desenvolvimento da NAFLD. Deste modo, verificou-se que na ausência do CD26, a expressão de genes pró-inflamatórios (*Tlr4*, *Myd88*, *Tnf- α* e *Il1 β*) e de indução de fenótipo M1 nas KC (*Arg1*) não foi diferente em preparações de NPC de murganhos do grupo 12%G30%F comparativamente aos animais do grupo controlo. Para além disso, após a exposição ao regime 12%G30%F, a expressão dos genes pró-fibróticos testados (*Tgfb1*, *Fn1* e *Pdgfb*) também não estava significativamente aumentada nas NPC dos murganhos *Cd26* KO relativamente ao respectivo grupo controlo e contrariamente ao que se tinha observado para os murganhos WT. Estes resultados indicam que a expressão da molécula CD26 nas NPC tem um papel central na indução da resposta inflamatória hepática que está subjacente à NAFLD induzida por dietas ricas em glicose/frutose.

3. O papel do CD26 na activação das células de *Kupffer*

Uma vez que a expressão genética do CD26 esteve aumentada nas NPC de murganhos com evidências hepáticas da NAFLD e que a ausência desta molécula atenuou a resposta pró-inflamatória e pró-fibrótica destas células, prevenindo do aparecimento desta patologia após exposição ao regime 12%G30%F, investigou-se se o CD26 contribui, directamente, para activação das KC, importantes mediadoras do processo inflamatório da NAFLD.

Para isso, culturas primárias de NPC enriquecidas em KC foram estimuladas com diferentes biomoléculas “inflamatórias” (LPS) e/ou “lipogénicas” (ácido palmítico) para mimetizar os estímulos dietéticos e comparadas com outra população de macrófagos isolados da cavidade peritoneal (MacPercav).

Foi possível verificar que apesar dos MacPercav apresentarem alguma actividade residual de DPP-IV, observou-se que a actividade peptidásica do CD26 foi superior no sobrenadante celular das KC, indicando que a sua activação implica o aumento de expressão de *Cd26*.

No nosso estudo, observou-se que a população de MacPercav produziu mais TNF- α , face aos diferentes estímulos, do que a população enriquecida em KC. De facto, em condições não patológicas, a localização anatómica e as funções biológicas das KC fazem com que estas células apresentem uma natureza fenotípica bastante menos pró-inflamatória do que outras populações de macrófagos (237). Por outro lado, as KC tiveram uma produção de IL-10 superior aos MacPercav, confirmando a heterogeneidade fenotípica destas duas populações de macrófagos. Contudo, a depleção genética do *Cd26* atenuou ainda mais a produção do TNF- α e da IL-10 nas KC comparativamente às KC isoladas de murganhos WT.

Estes resultados indicam que a expressão do *Cd26* nas KC contribui para a sua activação pro-inflamatória, sugerindo que a protecção da patologia da NAFLD nos murganhos *Cd26* KO sujeitos à dieta 12%G30%F poderá ser mediada pela atenuação da activação das KC.

No seu conjunto este trabalho permite levantar a hipótese que o CD26 expresso nas KC participa nas fases iniciais da indução da NAFLD por dietas ricas em glicose/frutose, promovendo o micro-ambiente pro-inflamatório. Estes resultados sugerem que a inibição da sinalização do CD26 nas KC poderá constituir uma estratégia terapêutica para a prevenção da NAFLD.

VI. CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O conjunto de resultados desta tese demonstrou que:

1. Apesar da NAFLD ser, frequentemente, diagnosticada em indivíduos obesos com hábitos de ingestão hipercalórica prolongados, os estadios mais precoces desta doença (i.e. a esteatose e balonização hepáticas) são observáveis após exposição calórica por períodos mais curtos e na ausência de perturbações relevantes do metabolismo sistémico.
2. A composição das dietas hipercalóricas ingeridas determina a indução de diferentes mecanismos patogénicos responsáveis pela NAFLD. Enquanto que a dieta tipo *Western* (rica em lípidos saturados e sacarose) induziu a expressão de genes envolvidos na LDN e no importe hepático de lípidos da dieta, o regime enriquecido em glicose e frutose revelou-se menos lipogénico mas mais hepatotóxico e indutor de expressão de mediadores pro-inflamatórios nas NPC, que são característicos da activação e resposta imunológica das KC. Para além disso, a exposição a esta dieta hipercalórica induziu a expressão de genes envolvidos no processo fibrótico sugerindo que uma exposição mais prolongada poderá promover a progressão para condições mais severas da NAFLD, como a fibrose hepática.
3. No contexto pró-inflamatório e pró-fibrótico induzido pelo regime enriquecido em glicose e frutose, observou-se que a expressão genética do *Cd26* nas NPC estava aumentada enquanto que a depleção genética desta molécula conferiu protecção da lesão hepática e inibiu as respostas pró-inflamatória e pró-fibrótica das NPC, suscitando a hipótese do CD26 ser uma molécula-chave na imunopatogénese da NAFLD.
4. A expressão do CD26 nas KC contribui para a resposta pró-inflamatória a estímulos inatos (TNF- α e IL-10).

No seu conjunto, os resultados dos estudos *in vivo* e *in vitro* desta tese permitiram concluir que a exposição a dietas suplementadas em frutose, induz a NAFLD por um mecanismo pró-inflamatório e pró-fibrótico mediado pelas KC e em que o CD26 tem um papel activador das respostas inflamatórias que conduzem à NAFLD.

Esta tese sugere que a expressão do CD26 nas KC como um mecanismo de indução da NAFLD abrindo a possibilidade de esta ser considerada como uma molécula alvo para estratégias de prevenção da NAFLD.

VII. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Tsatsoulis A, Mantzaris MD, Bellou S, Andrikoula M. Insulin resistance: an adaptive mechanism becomes maladaptive in the current environment - an evolutionary perspective. *Metabolism* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013 May [cited 2014 Sep 22];62(5):622–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23260798>
2. Speakman JR. Thrifty genes for obesity and the metabolic syndrome--time to call off the search? *Diab Vasc Dis Res* [Internet]. 2006 May [cited 2014 Sep 22];3(1):7–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16784175>
3. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB OB. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 1980;55(7):434–8.
4. Sheth SG, Gordon FD CS. Nonalcoholic steatohepatitis. *Ann Intern Med.* 1997;126(2):137–45.
5. F Schaffner. Nonacoholic fatty liver disease. *Prog Liver Dis.* 1986;8:283–98.
6. Durazzo M, Belci P, Collo A, Grisoglio E, Bo S. Focus on therapeutic strategies of nonalcoholic Fatty liver disease. *Int J Hepatol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2014 Sep 22];2012:464706. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3502854&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
7. Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* [Internet]. 2011 Jun 24 [cited 2014 Sep 22];332(6037):1519–23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3229276&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
8. Szczepaniak LS, Nurenberg P, Leonard D, Browning JD, Reingold JS, Grundy S, et al. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: prevalence of hepatic steatosis in the general population. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005;288(2):E462–8.
9. Brunt EM TD. Alcoholic and non-alcoholic fatty liver disease. In: Odze, R; Goldblum, JR; Crawford J, editor. *Surgical Pathology of the GI tract, Liver, Biliary Tract and Pancreas* [Internet]. 2nd ed. Philadelphia, USA: Elsevier B.V.; 2009. p. 1087–114. Available from: <http://www.us.elsevierhealth.com/pathology/odze-and-goldblum-surgical-pathology-of-the-gi-tract-liver-biliary-tract-and-pancreas-expert-consult/9781455707478/> - See more at: http://eprint.ncl.ac.uk/pub_details2.aspx?pub_id=205858#sthash.AedR7FXi.dpuf
10. de Alwis NMW, Day CP. Non-alcoholic fatty liver disease: the mist gradually clears. *J Hepatol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2014 Sep 1];48 Suppl 1:S104–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304679>
11. Takahashi Y. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012;18(19):2300.
12. Musso G, Gambino R, Cassader M PG. Meta-analysis: natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med.* 2011;43(8):617–49.
13. Ekstedt M, Franzén LE, Mathiesen UL, Thorelius L, Holmqvist M, Bodemar G, et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. *Hepatology* [Internet]. 2006 Oct [cited 2014 Oct 14];44(4):865–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17006923>
14. Argo CK CS. Epidemiology and natural history of non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.* 2009;13(4):511–31.
15. Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2006 May [cited 2014 Sep 12];290(5):G852–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16603729>

16. White D, Kanwal F, El-Serag H. Association between nonalcoholic fatty liver disease and risk for hepatocellular cancer, based on systematic review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2012;10(12):1342–59.
17. Yasui K, Hashimoto E, Tokushige K, Koike K, Shima T, Kanbara Y, Saibara T, Uto H, Takami S, Kawanaka M, Komorizono Y OT. Clinical and pathological progression of non-alcoholic steatohepatitis to hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2012;42(8):767–73.
18. Hepatocellular C. Patients to Hepatocellular Carcinoma in the Absence of Cirrhosis ? 2007;1761–6.
19. Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, Guedj N, Degos F, Vilgrain V, et al. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology*. 2009;49:851–9.
20. Machado MV, Cortez-Pinto H. Non-alcoholic fatty liver disease: what the clinician needs to know. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20(36):12956–80. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4177476&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
21. Rohit Loomba & Arun J. Sanyal. The global NAFLD epidemic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10:686–90.
22. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* [Internet]. 2004 Dec [cited 2014 Sep 15];40(6):1387–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15565570>
23. Schwimmer JB1, Deutsch R, Kahen T, Lavine JE, Stanley C BC. Prevalence of fatty liver in children and adolescents. *Pediatrics*. 2006;108(4):1388–93.
24. Vernon G, Baranova a, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2011 Aug [cited 2014 Jul 10];34(3):274–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21623852>
25. Eguchi Y, Hyogo H, Ono M, Mizuta T, Ono N, Fujimoto K, Chayama K ST. Prevalence and associated metabolic factors of nonalcoholic fatty liver disease in the general population from 2009 to 2010 in Japan: a multicenter large retrospective study. *J Gastroenterol*. 2012;47(5):586–95.
26. Farrell GC, Wong VW CS. NAFLD in Asia--as common and important as in the West. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(5):307–18.
27. Onyekwere CA, Ogbera AO BB. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome in an urban hospital serving an African community. *Ann Hepatol*. 2011;10(2):119–24.
28. Federation ID. IDF WORLDWIDE DEFINITION OF THE METABOLIC SYNDROME. [Internet]. 2014. Available from: <http://www.idf.org/metabolic-syndrome>
29. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* [Internet]. 2003 Apr [cited 2014 Sep 8];37(4):917–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668987>
30. Sahini N, Borlak J. Recent insights into the molecular pathophysiology of lipid droplet formation in hepatocytes. *Prog Lipid Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014 Apr [cited 2014 Sep 4];54:86–112. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24607340>
31. Strable MS, Ntambi JM. Genetic control of de novo lipogenesis: role in diet-induced obesity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* [Internet]. 2010 Jun [cited 2014 Oct 13];45(3):199–214. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2874080&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. Anstee QM, Targher G DC. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10(6):330–44.
 33. Blachier M, Leleu H, Peck-radosavljevic M. The Burden of liver disease in Europe A review of available epidemiological data. 2013;
 34. Forbes S, Taylor-Robinson SD, Patel N, Allan P, Walker BR, Johnston DG. Increased prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in European women with a history of gestational diabetes. *Diabetologia* [Internet]. 2011 Mar [cited 2014 Nov 7];54(3):641–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21153530>
 35. Koehler EM, Schouten JNL, Hansen BE, van Rooij FJA, Hofman A, Stricker BH, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease in the elderly: results from the Rotterdam study. *J Hepatol* [Internet]. 2012 Dec [cited 2014 Nov 7];57(6):1305–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22871499>
 36. Hilden M, Christoffersen P, Juhl E DJ. Liver histology in a normal" population: examinations of 503 consecutive fatal traffic casualties. *Scand J Gastroenterol*. 1977;12(5):593–7.
 37. Petersen KF, Dufour S, Feng J et al. Increased prevalence of insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease in Asian-Indian men. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(48):18273–7.
 38. Schneider ALC, Lazo M, Selvin E, Clark JM. Racial differences in nonalcoholic fatty liver disease in the U.S. population. *Obesity (Silver Spring)* [Internet]. 2014;22(1):292–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3690150&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 39. Pouneh S. Mofrad AJS. Nonalcoholic Fatty Liver Disease [Internet]. 2003. Available from: <http://www.medscape.com/>
 40. Piccinino F, Sagnelli E, Pasquale G GG. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. *J Hepatol*. 1986;2(2):165–73.
 41. Bugianesi E, Manzini P, D'Antico S, Vanni E, Longo F, Leone N, et al. Relative contribution of iron burden, HFE mutations, and insulin resistance to fibrosis in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* [Internet]. 2004 Jan [cited 2014 Sep 25];39(1):179–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14752836>
 42. Leon A Adams KDL and PA. The Prevalence of Autoantibodies and Autoimmune Hepatitis in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver DiseaseThe Prevalence of Autoantibodies and Autoimmune Hepatitis. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2004;99:1316–20. Available from: doi:10.1111/j.1572-0241.2004.30444.x
 43. Angulo P, Hui JM, Marchesini G, Bugianesi E, George J, Farrell GC, et al. The NAFLD fibrosis score: A noninvasive system that identifies liver fibrosis in patients with NAFLD. *Hepatology*. 2007;45(4):846–54.
 44. Milner K-L, van der Poorten D, Xu A, Bugianesi E, Kench JG, Lam KSL, et al. Adipocyte fatty acid binding protein levels relate to inflammation and fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* [Internet]. 2009 Jun [cited 2014 Sep 25];49(6):1926–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19475694>
 45. Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez a R, Liu Y-C, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: a multicenter validation study. *Hepatology* [Internet]. 2009 Oct [cited 2014 Sep 12];50(4):1072–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2757511&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- trez&rendertype=abstract
46. Li H, Fang Q, Gao F, Fan J, Zhou J, Wang X, et al. Fibroblast growth factor 21 levels are increased in nonalcoholic fatty liver disease patients and are correlated with hepatic triglyceride. *J Hepatol* [Internet]. European Association for the Study of the Liver; 2010 Nov [cited 2014 Sep 25];53(5):934–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20675007>
 47. Mummadi RR1, Kasturi KS, Chennareddygar S SG. Effect of bariatric surgery on nonalcoholic fatty liver disease: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2008;6(12):1396–402.
 48. Hashmi S, Wang Y, Parhar RS, Collison KS, Conca W, Al-Mohanna F, et al. A *C. elegans* model to study human metabolic regulation. *Nutr Metab (Lond)* [Internet]. 2013;10(1):31. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3636097&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 49. Nagarajan P, Venkatesan R, Kumar M, Usmani A MS. *Macaca radiata* (bonnet monkey): a spontaneous model of nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2008;28(6):856–64.
 50. Kanuri G, Bergheim I. In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013;14(6):11963–80. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3709766&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 51. Nagarajan P, Mahesh Kumar MJ, Venkatesan R, Majundar SS, Juyal RC. Genetically modified mouse models for the study of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2012;18(11):1141–53. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3309902&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 52. Tilg H, Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010 Dec;52(5):1836–46.
 53. Hooper AJ, Adams L a, Burnett JR. Genetic determinants of hepatic steatosis in man. *J Lipid Res* [Internet]. 2011 Apr [cited 2014 Sep 22];52(4):593–617. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3053205&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 54. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* [Internet]. 2006;87(1):1–16. Available from: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=16436109&retmode=ref&cmd=prlinks\papers2://publication/doi/10.1111/j.0959-9673.2006.00465.x>
 55. INGALLS AM, DICKIE MM SG. Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered*. 1950;41(12):317–8.
 56. Drasher D and L. PHYSIOLOGICAL DIFFERENCES IN UTERI OF OBESE STOCK MICE: A Comparison Between Obese Mice and their Thin Sibs. *J Hered*. 1955;46(5):209–12.
 57. MAYER J, BATES MW DM. Hereditary diabetes in genetically obese mice. *Science* (80-). 1951;2948(2948):746–7.
 58. Katsuda Y, Ohta T, Shinohara M, Bin T, Yamada T. Diabetic mouse models. *Open J Anim Sci* [Internet]. 2013;03(04):334–42. Available from: <http://www.scirp.org/journal/PaperDownload.aspx?DOI=10.4236/ojas.2013.34050>
 59. Faggioni R, Fantuzzi G, Gabay C, Moser a, Dinarello C a, Feingold KR, et al. Leptin deficiency enhances sensitivity to endotoxin-induced lethality. *Am J Physiol*. 1999;276:R136–42.
 60. Brix AE, Elgavish A, Nagy TR, Gower BA, Rhead WJ WP. Evaluation of liver

- fatty acid oxidation in the leptin-deficient obese mouse. *Mol Genet Metab.* 2002;75(3):219–26.
61. Yang SQ, Lin HZ, Lane MD, Clemens M, Diehl AM. Obesity increases sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(6):2557–62.
 62. Koteish Ayman DA. Animal models of Steatosis. 2011;1–17. Available from: papers2://publication/doi/10.1037/a0023766
 63. Swellam M, Hamdy N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with a single nucleotide polymorphism on the gene encoding leptin receptor. *IUBMB Life* [Internet]. 2012;64(2):180–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22215535>
 64. Aller R, De Luis DA, Izaola O, González Sagrado M, Conde R, Pacheco D, Velasco MC OH. Lys656Asn polymorphism of leptin receptor, leptin levels and insulin resistance in patients with non alcoholic fatty liver disease. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012;16(3):335–41.
 65. Wortham M, He L, Gyamfi M, Copple BL, Wan Y-JY. The transition from fatty liver to NASH associates with SAMe depletion in db/db mice fed a methionine choline-deficient diet. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2008;53(10):2761–74. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3991247&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 66. Rodrigues A, Almeida H, Gouveia A. Obesidade : O Papel das Melanocortinas na regulação da Homeostasia Energética Obesity : the role of melanocortins in the regulation of energy homeostasis. 2011;76–86.
 67. Nishimura M. Breeding of Mice Strains for Diabetes Mellitus. *Exp Anim.* 1969;18:147–57.
 68. Miller MW, Duhl DMJ, Vrieling H, Cordes SP, Ollmann MM, Winkes BM, et al. Cloning of the mouse agouti gene predicts a secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Genes Dev.* 1993;7:454–67.
 69. Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO et al. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature.* 1994;371(6500):799–802.
 70. Masaki T, Chiba S, Tatsukawa H, Yasuda T, Noguchi H, Seike M, et al. Adiponectin protects LPS-induced liver injury through modulation of TNF- α in KK-Ay obese mice. *Hepatology.* 2004;40(1):177–84.
 71. Huszar D, Lynch C a, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* [Internet]. Cell Press; 1997;88(1):131–41. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81865-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81865-6)
 72. Albarado DC, McClaine J, Stephens JM, Mynatt RL, Ye J, Bannon AW, et al. Impaired Coordination of Nutrient Intake and Substrate Oxidation in Melanocortin-4 Receptor Knockout Mice. *Endocrinology* [Internet]. 2004;145(1):243–52. Available from: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/en.2003-0452>
 73. Itoh M, Suganami T, Nakagawa N, Tanaka M, Yamamoto Y, Kamei Y, et al. Melanocortin 4 receptor-deficient mice as a novel mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2011;179(5):2454–63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3204024&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 74. Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga JI, Tamura Y, et al. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem.* 1999;274(50):35832–9.

75. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest* [Internet]. 2008;118(3):829–38. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2254980&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
76. Nakayama H, Otabe S, Ueno T, Hirota N, Yuan X, Fukutani T, Hashinaga T, Wada N YK. Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism*. 2007;56(4):470–5.
77. Shimomura I, Hammer RE, Richardson J a., Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL, et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: Model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev*. 1998;12(20):3182–94.
78. Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest*. 1996;98(7):1575–84.
79. U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services. Dietary Guidelines for Americans, 2010. 7Th Ed. 2010;76.
80. Bray GA, Paeratakul S PB. Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiol Behav*. 2004;83(4):549–55.
81. A.M. Z, J.B. G, A.J. S. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: Implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2007;86(2):285–300. Available from: <http://www.ajcn.org/cgi/reprint/86/2/285>
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=J&S&PAGE=reference&D=emed8&NEWS=N&AN=2007401514>
82. Kargulewicz A, Stankowiak-Kulpa H, Grzymisławski M. Dietary recommendations for patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Przegląd Gastroenterol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Sep 22];9(1):18–23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4027841&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
83. Lieber CS, Leo M a, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Nutr* [Internet]. 2004;79(1):502–9. Available from: <http://www.ajcn.org/content/79/3/502.short>
84. Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, et al. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci*. 2006;79(11):1100–7.
85. Ito M, Suzuki J, Tsujioka S, Sasaki M, Gomori A, Shirakura T, Hirose H, Ito M, Ishihara A, Iwaasa H KA. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatol Res*. 2007;37(1):50–7.
86. Deng QG, She H, Cheng JH, French SW, Koop DR, Xiong S, et al. Steatohepatitis induced by intragastric overfeeding in mice. *Hepatology*. 2005;42(4):905–14.
87. Leamy AK, Egnatchik R a, Young JD. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 Jan [cited 2014 Sep 22];52(1):165–74. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3868987&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
88. Wang D, Wei Y, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. *Endocrinology* [Internet]. 2006 Feb [cited 2014 Oct 16];147(2):943–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16269465>
89. Bayol SA. A maternal “junk food” diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic fatty liver disease in rat offspring. *Endocrinology*. 2010;151:1451–

- 61.
90. Lustig RH. Fructose: it's "alcohol without the buzz". *Adv Nutr* [Internet]. 2013 Mar;4(2):226–35. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3649103&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
91. Tappy L, Lê K a., Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: New findings, new questions. *Nutrition* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;26(11-12):1044–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nut.2010.02.014>
92. Spruss A Bl. Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem*. 2009;20(9):657–62.
93. Assy N, Nasser G, Kamayse I, Nseir W. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. 2008;22(10):811–6.
94. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, et al. Fructose consumption as a risk factor non-alcoholic fatty liver disease. 2009;48(6):993–9.
95. Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, et al. Rats Fed Fructose-Enriched Diets Have Characteristics of Nonalcoholic Hepatic Steatosis. *J Nutr*. 2009;139:2067–71.
96. Ackerman Z, Oron-Herman M, Grozovski M, Rosenthal T, Pappo O, Link G, et al. Fructose-induced fatty liver disease: Hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension*. 2005;45(5):1012–8.
97. Armutcu F, Coskun O, Gürel A, Kanter M, Can M, Ucar F, et al. Thymosin alpha 1 attenuates lipid peroxidation and improves fructose-induced steatohepatitis in rats. *Clin Biochem* [Internet]. 2005;38(6):540–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15885234>
98. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology* [Internet]. 2009 Oct [cited 2014 Nov 5];50(4):1094–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19637282>
99. Kohli R, Kirby M, Xanthakos SA, Softic S, Feldstein AE, Saxena V, et al. High-fructose, medium chain trans fat diet induces liver fibrosis and elevates plasma coenzyme Q9 in a novel murine model of obesity and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* [Internet]. 2010;52(3):934–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.23797>
100. Charlton M, Krishnan a., Viker K, Sanderson S, Cazanave S, McConico a., et al. Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *AJP Gastrointest Liver Physiol*. 2011;301(5):G825–34.
101. Yao ZM VD. Reduction in VLDL, but not HDL, in plasma of rats deficient in choline. *Biochem Cell Biol*. 1990;68(2):552–8.
102. Zeisel SH BJ. Choline and human nutrition. *Annu Rev Nutr*. 1994;14:269–96.
103. Leclercq I a, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest* [Internet]. 2000;105(8):1067–75. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=300833&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
104. Larter CZ, Yeh MM, Williams J, Bell-Anderson KS, Farrell GC. MCD-induced steatohepatitis is associated with hepatic adiponectin resistance and adipogenic transformation of hepatocytes. *J Hepatol*. 2008;49(3):407–16.
105. Rinella ME, Elias MS, Smolak RR, Fu T, Borensztajn J, Green RM. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J Lipid Res* [Internet]. 2008;49(5):1068–76. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2311450&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
106. Rangnekar AS, Lammert F, Igochnikov A, Green RM. Quantitative trait loci

- analysis of mice administered the methionine-choline deficient dietary model of experimental steatohepatitis. *Liver Int* [Internet]. 2006;26(8):1000–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16953841>
107. Yamazaki Y, Kakizaki S, Takizawa D, Ichikawa T, Sato K, Takagi H, et al. Interstrain differences in susceptibility to non-alcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2008;23(2):276–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868334>
 108. Pogribny IP, Tryndyak VP, Bagnyukova T V., Melnyk S, Montgomery B, Ross S a., et al. Hepatic epigenetic phenotype predetermines individual susceptibility to hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methyl-deficient diet. *J Hepatol* [Internet]. European Association for the Study of the Liver; 2009;51(1):176–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2009.03.021>
 109. Sahai A, Malladi P, Pan X, Paul R, Melin-Aldana H, Green RM, et al. Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004;287(5):G1035–43.
 110. Ip E, Farrell GC, Robertson G, Hall P, Kirsch R, Leclercq I. Central role of PPARalpha-dependent hepatic lipid turnover in dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* [Internet]. 2003;38(1):123–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12829994>
 111. Kashireddy PV RM. Lack of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in mice enhances methionine and choline deficient diet-induced steatohepatitis. *Hepatol Res*. 2004;30(2):104–10.
 112. Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J*. 2005;19(1):136–8.
 113. Arsov T, Larter CZ, Nolan CJ, Petrovsky N, Goodnow CC, Teoh NC, Yeh MM FG. Adaptive failure to high-fat diet characterizes steatohepatitis in *Alms1* mutant mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;342(4):1152–9.
 114. Sundaram SS, Whittington PF, Green RM. Steatohepatitis develops rapidly in transgenic mice overexpressing *Abcb11* and fed a methionine-choline-deficient diet. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2005;288(6):G1321–7. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15650132
 115. Koo S-H. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clin Mol Hepatol* [Internet]. 2013 Sep;19(3):210–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3796672&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov/entrez&rendertype=abstract>
 116. Day CP JO. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842–5.
 117. Tiniakos DG, Vos MB, Brunt EM. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu Rev Pathol*. 2010 Jan;5:145–71.
 118. L. J. Dixon, M. Barnes, H. Tang, M. T. Pritchard and LEN. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol*. 2013;3(2):785–97.
 119. Duarte N, Coelho IC, Patarrão RS, Almeida JI, Penha-Gonçalves C, Macedo MP. How Inflammation Impinges on NAFLD: A Role for Kupffer Cells. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:984578. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4450298&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov/entrez&rendertype=abstract>
 120. Kolios G, Valatas V, Kouroumalis E. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2006;12(46):7413–20. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4087584&tool=pmc.ncbi.nlm.nih.gov/entrez&rendertype=abstract>

121. Baffy G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. *J Hepatol*. 2010;51(1):212–23.
122. Kupffer. Über sternzellen der leber. *Arch Mikr Anat*. 1876;12:353–8.
123. Szymańska R S-PM. Studies of liver's reticuloendothelial cells by Tadeusz Browicz and Karl Kupffer. A historical outline. *Arch Hist Med (Warsz)*. 1979;42(3):331–6.
124. Wisse E. Kupffer cell reactions in rat liver under various conditions as observed in the electron microscope. *J Ultrastruct Res*. 1974;46(3):499–520.
125. Wisse E. Observations on the fine structure and peroxidase cytochemistry of normal rat liver Kupffer cells. *J Ultrastruct Res*. 1974;46(3):393–426.
126. Bouwens L, Baekeland M, De Zanger R, Wisse E. Quantitation, tissue distribution and proliferation kinetics of Kupffer cells in normal rat liver. *Hepatology* [Internet]. 1986;6(4):718–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3733004>
127. Malarkey DE, Johnson K, Ryan L, Boorman G, Maronpot RR. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicol Pathol* [Internet]. 2005 Jan [cited 2014 Oct 12];33(1):27–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15805053>
128. Freudenberg N, Schalk J, Galanos C, Katschinski T, Datz O, Pein U FM. Identification and percentage frequency of isolated non-parenchymal liver cells (NPLC) in the mouse. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. 1989;57(2):109–15.
129. Klein I, Cornejo JC, Polakos NK, John, Beena, Wuensch S a, Topham DJ, Pierce RH, et al. Kupffer cell heterogeneity: functional properties of bone marrow–derived and sessile hepatic macrophages. *Cell*. 2007;110(12):4077–85.
130. MacPhee PJ, Schmidt EE GA. Evidence for Kupffer cell migration along liver sinusoids, from high-resolution in vivo microscopy. *Am J Physiol*. 1992;263:17–23.
131. Smedsrod B, De Bleser PJ, Braet F, Lovisetti P, Vanderkerken K, Wisse E et al. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut*. 1994;35:1509–16.
132. Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* [Internet]. 1990;192(2):245–61. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19222.x/abstract>
133. Racanelli V, Rehmann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology* [Internet]. 2006;43(2 Suppl 1):S54–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16447271>
134. Burgio VL, Ballardini G, Artini M, Caratozzolo M, Bianchi FB, Levrero M. Expression of co-stimulatory molecules by Kupffer cells in chronic hepatitis of hepatitis C virus etiology. *Hepatology* [Internet]. 1998;27(6):1600–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620333>
135. Gao B, Jeong W-I, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology* [Internet]. 2008;47(2):729–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18167066>
136. Thurman RG. II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol*. 1998;275(4 Pt 1):G605–11.
137. LE N. Recent insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease. *Exp Biol Med*. 2003;228(8):882–90.
138. Heilbronn LK CL. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. *Curr Pharm Des*. 2008;14(12):1225–30.
139. Park J-W, Jeong G, Kim SJ, Kim MK, Park SM. Predictors reflecting the pathological severity of non-alcoholic fatty liver disease: comprehensive study of clinical and immunohistochemical findings in younger Asian patients. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2007;22(4):491–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376039>
140. Lefkowitz JH, Haythe JH, Regent N. Kupffer cell aggregation and perivenular

- distribution in steatohepatitis. *Mod Pathol*. 2002;15(7):699–704.
141. Rivera CA, Adegboyega P, Rooijen N Van, Tagalicud A, Wallace M. Toll-like receptor-4 signaling and Kupffer cells play pivotal roles in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. 2007;47(4):571–9.
 142. Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, et al. Depletion of Liver Kupffer Cells Prevents the Development of Diet-Induced Hepatic Steatosis and Insulin Resistance. 2010;59(February):347–57.
 143. Zeng T, Liu F, Zhou J, Pan S, Xia W, Chen L. Depletion of Kupffer cells attenuates systemic insulin resistance , inflammation and improves liver autophagy in high-fat diet fed mice. 2015;62(7):615–26.
 144. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81(1):1–5.
 145. Bergheim I, Weber S, Vos M, Krämer S, Volynets V, Kaserouni S, et al. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: role of endotoxin. *J Hepatol*. 2008 Jun;48(6):983–92.
 146. Thuy S, Ladurner R, Volynets V, Wagner S, Strahl S, Königsrainer A, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in humans is associated with increased plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr* [Internet]. 2008;138(8):1452–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18641190>
 147. Roh, Yoon-Seok and Seki E. Toll-Like Receptors in Alcoholic Liver Disease, Non-Alcoholic Steatohepatitis and Carcinogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013;28(0 1):38–42.
 148. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner D a, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*. 2007 Nov;13(11):1324–32.
 149. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Cell Death Differ* [Internet]. 2006;13(5):816–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16410796>
 150. Meli R, Mattace Raso G, Calignano A. Role of innate immune response in non-alcoholic Fatty liver disease: metabolic complications and therapeutic tools. *Front Immunol* [Internet]. 2014 Jan [cited 2014 Sep 22];5(April):177. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4005965&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 151. Núñez Miguel R, Wong J, Westoll JF, Brooks HJ, O'Neill LAJ, Gay NJ, et al. A dimer of the Toll-like receptor 4 cytoplasmic domain provides a specific scaffold for the recruitment of signalling adaptor proteins. *PLoS One* [Internet]. 2007;2(8):e788. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0000788>
 152. Zhai Y, Shen X, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttil RW, et al. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway. *J Immunol (Baltimore, Md 1950)* [Internet]. 2004;173(12):7115–9. Available from: <http://www.jimmunol.org/content/173/12/7115.full.pdf>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585830>
 153. Hritz I, Mandrekar P, Velayudham A, Catalano D, Dolganiuc A, Kodys K, et al. The critical role of toll-like receptor (TLR) 4 in alcoholic liver disease is independent of the common TLR adapter MyD88. *Hepatology* [Internet]. 2008;48(4):1224–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18792393>
 154. Miura K, Kodama Y, Inokuchi S, Schnabl B, Aoyama T, Ohnishi H, et al. Toll-like receptor 9 promotes steatohepatitis by induction of interleukin-1beta in mice. *Gastroenterology*. Elsevier Inc.; 2010 Jul;139(1):323–34.e7.
 155. Kendrick S, Leathart JB, Henderson E, De Alwis N, Stewart S, Burt AD, Daly AK
DC-S more at: http://eprint.ncl.ac.uk/pub_details2.

- aspx?pub_id=148658#sthash.36YO2Umz.dpu. A “loss-of-function” mutation in TIRAP, the gene encoding the Toll-like receptor adapter molecule MAL protects against fibrosis in NAFLD but not ALD. [Internet]. San Francisco, CA, USA; 2008. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/hep.22615>
156. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* [Internet]. 2014;6(March):1–13. Available from: <http://www.f1000.com/prime/reports/b/6/13>
 157. Mantovani AS and A. Macrophage plasticity and polarization:in vivo veritas. 2012;122(3):787–95.
 158. S G. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23–35.
 159. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* [Internet]. 2005 May;115(5):1343–51. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1087172&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 160. Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2014 Nov 7];3(2):785–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720329>
 161. Tang T, Sui Y, Lian M, Li Z, Hua J. Pro-inflammatory activated Kupffer cells by lipids induce hepatic NKT cells deficiency through activation-induced cell death. *PLoS One*. 2013 Jan;8(12):e81949.
 162. Kim JK. Fat uses TOLL-road to connect inflammation and diabetes. *Cell Metab*. 2006;4(December):417–9.
 163. Lee JY, Hwang DH. The modulation of inflammatory gene expression by lipids: mediation through Toll-like receptors. *Mol Cells*. 2006;21(2):174–85.
 164. Shi H, Kokoeva M V, Inouye K, Tzameli I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid – induced insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(11):3015–25.
 165. Lee JY, Ye J, Gao Z, Youn HS, Lee WH, Zhao L, et al. Reciprocal Modulation of Toll-like Receptor-4 Signaling Pathways Involving MyD88 and Phosphatidylinositol 3-Kinase / AKT by Saturated and Polyunsaturated Fatty Acids *. 2003;278(39):37041–51.
 166. Farrell GC, Teoh NC, Mccuskey RS. Hepatic Microcirculation in Fatty Liver Disease. *Anat Rec Adv Integr Anat Evol Biol* [Internet]. 2008;291(6):684–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ar.20715>
 167. Jacquelyn J. Maher, Pablo Leon and JCR. Beyond Insulin Resistance: Innate Immunity in Nonalcoholic Steatohepatitis. *Hepatology*. 2008;48(2):670–8.
 168. Vandanmagsar B, Youm Y, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NALP3/NLRP3 Inflammasome Instigates Obesity-Induced Autoinflammation and Insulin Resistance. *Nat Med*. 2011;17(2):179–88.
 169. Terpstra V, Amersfoort ES Van, Velzen AG Van, Kuiper J, Berkel TJC Van. Hepatic and Extraheptic Scavenger Receptors: Function in Relation to Disease. *Arter Thromb Vas Biol*. 2000;20:1860–72.
 170. Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology* [Internet]. 2008;134(6):1655–69. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508508004290>
 171. Xidakis C, Ljumovic D, Manousou P, Notas G, Valatas V, Kolios G KE. Production of pro- and anti-fibrotic agents by rat Kupffer cells; the effect of octreotide. *Dig Dis Sci*. 2005;50(5):935–41.
 172. Meyer DH, Bachem MG GA. Modulation of hepatic lipocyte proteoglycan synthesis and proliferation by Kupffer cell-derived transforming growth factors type beta 1 and type alpha. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;171(3):1122–9.
 173. Matsuoka M TH. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer

- cell-derived transforming growth factor beta: implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology*. 1990;11(4):599–605.
174. Czaja MJ, Weiner FR, Flanders KC, Giambrone MA, Wind R, Biempica L, et al. In vitro and in vivo association of transforming growth factor-beta 1 with hepatic fibrosis. *J Cell Biol* [Internet]. 1989;108(6):2477–82. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2115595&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 175. Dixon JB, Bhathal PS, Jonsson JR, Dixon AF, Powell EE OP. Pro-fibrotic polymorphisms predictive of advanced liver fibrosis in the severely obese. *J Hepatol*. 2013;39(6):967–71.
 176. Knittel T, Mehde M, Kobold D, Saile B, Dinter C RG. Expression patterns of matrix metalloproteinases and their inhibitors in parenchymal and non-parenchymal cells of rat liver: regulation by TNF-alpha and TGF-beta1. *J Hepatol*. 1999;30(1):48–60.
 177. Friedman SL, Arthur MJP. Activation of culture rat hepatic lipocytes by Kupffer cell-conditioned medium. *J Clin Invest*. 1989;84(December):1780–5.
 178. Marra F, Romanelli RG, Giannini C, Failli P, Pastacaldi S, Arrighi MC, et al. Monocyte chemotactic protein-1 as a chemoattractant for human hepatic stellate cells. *Hepatology* [Internet]. 1999;29(1):140–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9862860> \n http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/hep.510290107/asset/510290107_ft.pdf?v=1&t=hey1ei5y&s=e99e6423514b13bf1c6accd0b2c81c5aa1af5734
 179. Yin C, Evason K. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clinical Investig* [Internet]. 2013;123(5):1902–10. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/23635788>
 180. Benyon RC, Hovell CJ, Da Gaça M, Jones EH, Iredale JP, Arthur MJ. Progelatinase A is produced and activated by rat hepatic stellate cells and promotes their proliferation. *Hepatology* [Internet]. 1999;30(4):977–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10498650>
 181. Mallat A, Lodder J, Teixeira-Clerc F, Moreau R, Codogno P, Lotersztajn S. Autophagy: A Multifaceted Partner in Liver Fibrosis. *Biomed Res Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2014 Jan;2014:869390.
 182. Ahima RS, Lazar M a. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol*. 2008;22(5):1023–31.
 183. Jarrar MH, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, Fang Y, Elariny H, Goodman Z, Chandhoke V, Younossi ZM. Jarrar MH1, Baranova A, Collantes R, Ranard B, Stepanova M, Bennett C, Fang Y, Elariny H, Goodman Z, Chandhoke V YZ. Adipokines and cytokines in non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27(5):412–21.
 184. Cava A La, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2004;4(5):371–9. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri1350>
 185. Shen J, Sakaida I, Uchida K, Terao S OK. Leptin enhances TNF-alpha production via p38 and JNK MAPK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sci*. 2005;77(13):1502–15.
 186. Ikejima K, Okumura K, Kon K, Takei Y SN. Role of adipocytokines in hepatic fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol*. 200AD;23(3):501–2.
 187. Lee T-S, Lin C-Y, Tsai J-Y, Wu Y-L, Su K-H, Lu K-Y, et al. Resistin increases lipid accumulation by affecting class A scavenger receptor, CD36 and ATP-binding cassette transporter-A1 in macrophages. *Life Sci* [Internet]. 2009;84(3-4):97–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19041881>
 188. Moschen AR, Kaser A, Enrich B, Mosheimer B, Theurl M, Niederegger H, et al. Visfatin, an adipocytokine with proinflammatory and immunomodulating properties. *J Immunol*. 2007;178:1748–58.
 189. Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, et al.

- Insulin/Foxo1 Pathway Regulates Expression Levels of Adiponectin Receptors and Adiponectin Sensitivity. *J Biol Chem* [Internet]. 2004;279(29):30817–22. Available from: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M402367200>
190. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF- α or adiponectin? *Hepatology*. 2004;40(1):46–54.
 191. Kaser S, Moschen A, Cayon A, Kaser A, Crespo J, Ebenbichler CF, et al. Adiponectin and its receptors in non-alcoholic steatohepatitis. 2005;117–21.
 192. Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* [Internet]. 2000;96(5):1723–32. Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/96/5/1723.abstract>
 193. Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA SM. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316(3):924–9.
 194. Park P-H, Huang H, McMullen MR, Mandal P, Sun L, Nagy LE. Suppression of lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor- α production by adiponectin is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* [Internet]. 2008;283(40):26850–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2556004&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 195. Thakur V, Pritchard MT, McMullen MR, Nagy LE. Adiponectin normalizes LPS-stimulated TNF- α production by rat Kupffer cells after chronic ethanol feeding. 2006;4906:998–1007.
 196. De Meester I, Korom S, Van Damme J, Scharpé S. CD26, let it cut or cut it down. *Immunol Today* [Internet]. 1999 Aug;20(8):367–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24825423>
 197. Darmoul D, Lacasa M, Baricault L, Marguet D, Sapin C, Trotot P, et al. Dipeptidyl peptidase IV (CD 26) gene expression in enterocyte-like colon cancer cell lines HT-29 and Caco-2. *J Biol Chem*. 1992;267:4824–33.
 198. Itou M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sata M. Dipeptidyl peptidase-4: a key player in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2013;19(15):2298–306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23613622>
 199. Morimoto C, Schlossman SR. The structure and function of CD26 in the T-cell immune response. :55–71.
 200. Mattern T, Reich C, Schönbeck U, Ansorge S, Demuth HU, Loppnow H, Ulmer AJ FH. CD26 (dipeptidyl peptidase i.v.) on human T lymphocytes does not mediate adhesion of these cells to endothelial cells or fibroblasts. *Immunobiology*. 1998;198(4):465–75.
 201. Cheng H, Abdel-ghany M, Elble RC, Pauli BU. Lung Endothelial Dipeptidyl Peptidase IV Promotes Adhesion and Metastasis of Rat Breast Cancer Cells via Tumor Cell Surface- associated Fibronectin *. 1998;273(37):24207–15.
 202. Morrison BME, Vijayasaradhi S, Engelstein D, Albino AP, Houghton AN. A Marker for Neoplastic Progression of Human Melanocytes Is a Cell Surface Ectopeptidase By Mark E. Morrison, Setaluri Vijayasaradhi, Dov Engelstein, Anthony P. Albino, and Alan N. Houghton. 1993;177(April).
 203. Franco R, Valenzuela A, Lluís C BJ. Enzymatic and extraenzymatic role of ecto-adenosine deaminase in lymphocytes. *Immunol Rev*. 1998;161:27–42.
 204. Iwaki-Egawa S, Watanabe Y FY. CD26/dipeptidyl peptidase IV does not work as an adenosine deaminase-binding protein in rat cells. *Cell Immunol*. 1997;178(2):180–6.
 205. Zhong J, Rao X, Deiluiis J, Braunstein Z, Narula V, Hazey J, et al. A Potential Role for Dendritic Cell/Macrophage-Expressing DPP4 in Obesity-Induced Visceral Inflammation. *Diabetes* [Internet]. 2013;62(1):149–57. Available from: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db12-0230>

206. Marguet D, Baggio L, Kobayashi T, Bernard a M, Pierres M, Nielsen PF, et al. Enhanced insulin secretion and improved glucose tolerance in mice lacking CD26. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(12):6874–9.
207. Cook MJ. *The Anatomy of the Laboratory Mouse*. Carshalton: Academic Press Inc; First Edition edition (October 1965); 2005. 143 p.
208. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* [Internet]. 2005;41(6):1313–21. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.20701>
209. Laboratory TJ. *Mouse Genome Informatics* [Internet]. Available from: <http://www.informatics.jax.org/>
210. Sullivan S. Implications of Diet on Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Opin gastroenterology*. 2013;26(2):160–4.
211. Ribeiro G, Santos O, Sampaio D. Obesidade: um fenótipo de dependência? *Rev Port Endocrinol Diabetes e Metab* [Internet]. 2015;10(2):193–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1646343914000686>
212. Kenny PJ. Common cellular and molecular mechanisms in obesity and drug addiction. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;12(11):638–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn3105>
213. Stubbins RE, Holcomb VB, Hong J NN. Estrogen modulates abdominal adiposity and protects female mice from obesity and impaired glucose tolerance. *Eur J Nutr*. 2012;51(7):861–70.
214. Stubbins RE, Najjar K, Holcomb VB, Hong J, Núñez NP. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* [Internet]. 2012;14(1):58–66. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3236284&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
215. Pettersson US, Waldén TB, Carlsson P-O, Jansson L, Phillipson M. Female mice are protected against high-fat diet induced metabolic syndrome and increase the regulatory T cell population in adipose tissue. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(9):e46057. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0046057>
216. Ishimoto T, Lanasa MA, Rivard CJ, Roncal-Jimenez CA, Orlicky DJ, Cicerchi C, et al. High-fat and high-sucrose (western) diet induces steatohepatitis that is dependent on fructokinase. *Hepatology* [Internet]. 2013;58(5):1632–43. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.26594>
217. Newberry EP, Xie Y, Kennedy SM, Luo J, Davidson NO. Protection against Western diet-induced obesity and hepatic steatosis in liver fatty acid-binding protein knockout mice. *Hepatology* [Internet]. 2006;44(5):1191–205. Available from: http://onlinelibrary.wiley.com.liboff.ohsu.edu/doi/10.1002/hep.21369/abstract\nhttp://onlinelibrary.wiley.com.liboff.ohsu.edu/store/10.1002/hep.21369/asset/21369_ftp.pdf?v=1&t=gtbz1xgn&s=6bc359e7ef82b92c29164e71db16f947dbc1f25b
218. Ntambi JM, Miyazaki M, Stoehr JP, Lan H, Kendziora CM, Yandell BS, et al. Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002;99(17):11482–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=123282&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
219. Austyn JM, Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*. 1981;11(10):805–15.
220. Morris L, Graham CF, Gordon S. Macrophages in haemopoietic and other tissues of the developing mouse detected by the monoclonal antibody F4/80. *Development*. 1991;112(2):517–26.
221. Lin H-H, Faunce DE, Stacey M, Terajewicz A, Nakamura T, Zhang-Hoover J, et

- al. The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med* [Internet]. 2005;201(10):1615–25. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2212925&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
222. Cani P, Amar J, Iglesias M, Poggi M. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007;56(July):1761–72.
 223. Isibasi A, Jimenez E, Kumate J. Clearance and tissue distribution of intravenously injected *Salmonella typhi* polysaccharide in rabbits. *Infect Immun*. 1983;42(3):949–54.
 224. Stienstra R, Saudale F, Duval C, Keshtkar S, Groener JEM, van Rooijen N, et al. Kupffer cells promote hepatic steatosis via interleukin-1 β -dependent suppression of peroxisome proliferator-activated receptor α activity. *Hepatology*. 2010;51(2):511–22.
 225. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, Mizutani T, et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*. 2005;434(7030):243–9.
 226. Tsai J, Zhang R, Qiu W, Su Q, Naples M, Adeli K, et al. Inflammatory NF- κ B activation promotes hepatic apolipoprotein B100 secretion: evidence for a link between hepatic inflammation and lipoprotein production. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;1:1287–99.
 227. Chu CJ, Lu RH, Wang SS, Chang FY, Wu SL, Lu CL, Chun BC, Chang CY, Wu MY LS. Risk factors associated with non-alcoholic fatty liver disease in Chinese patients and the role of tumor necrosis factor- α . *Hepatogastroenterology*. 2007;54(79):2099–102.
 228. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of Liver Injury . I . TNF- α -induced liver injury: role of IKK , JNK , and ROS pathways. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2006;(290):583–9.
 229. Klune J, Dhupar R. HMGB1: Endogenous Danger Signaling. *Mol Med* [Internet]. 2008;14(7-8):1. Available from: http://www.molmed.org/content/pdfstore/476_484.Klune.00034.PDF
 230. Ahmed RH, Huri HZ, Al-Hamodi Z, Salem SD, Muniandy S. Serum Levels of Soluble CD26/Dipeptidyl Peptidase-IV in Type 2 Diabetes Mellitus and Its Association with Metabolic Syndrome and Therapy with Antidiabetic Agents in Malaysian Subjects. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(10):e0140618. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26474470>
 231. Drucker D. Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibition and the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2007;30(6):1335–43. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/content/30/6/1335.short>
 232. Ryskjaer J, Deacon CF, Carr RD, Krarup T, Madsbad S, Holst J, et al. Plasma dipeptidyl peptidase-IV activity in patients with type-2 diabetes mellitus correlates positively with HbA1c levels, but is not acutely affected by food intake. *Eur J Endocrinol* [Internet]. 2006;155(3):485–93. Available from: <http://www.eje-online.org/cgi/doi/10.1530/eje.1.02221>
 233. Pala L, Rotella CM. The Role of DPP4 Activity in Cardiovascular Districts: In Vivo and In Vitro Evidence. *J Diabetes Res* [Internet]. 2013;2013:1–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3703341&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 234. Pro B, Dang NH. CD26/dipeptidyl peptidase IV and its role in cancer. *Histol Histopathol*. 2004;19(4):1345–51.
 235. Zhao Y, Yang L, Wang X ZZ. The new insights from DPP-4 inhibitors: their potential immune modulatory function in autoimmune diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 2014;30(8):646–53.
 236. Balaban YH, Korkusuz P, Simsek H, Gokcan H, Gedikoglu G, Pinar A, et al.

- Dipeptidyl peptidase IV (DDP IV) in NASH patients. *Ann Hepatol Off J Mex Assoc Hepatol* [Internet]. 2007;6(4):242–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18007554>
237. Movita D, Kreefft K, Biesta P, van Oudenaren a., Leenen PJM, Janssen HL a., et al. Kupffer cells express a unique combination of phenotypic and functional characteristics compared with splenic and peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol*. 2012;92(4):723–33.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

Co-autoria no Artigo de Revisão

How Inflammation Impinges on NAFLD: A Role for Kupffer Cells

BioMed Research International

5 de Março de 2015

Review Article

How Inflammation Impinges on NAFLD: A Role for Kupffer Cells

Nádia Duarte,^{1,2} Inês C. Coelho,^{1,2} Rita S. Patarrão,^{1,2} Joana I. Almeida,²
Carlos Penha-Gonçalves,^{2,3} and M. Paula Macedo^{1,3}

¹CEDOC, NOVA Medical School, Faculdade de Ciências Médicas (NMS/FCM), Universidade Nova de Lisboa, Edifício CEDOC II, Rua Câmara Pestana, Nos. 6, 6A, 6B, Laboratory 3.8, Piso 3, 1150-082 Lisboa, Portugal

²Instituto Gulbenkian de Ciência (IGC), Rua da Quinta Grande 6, 2780-156 Oeiras, Portugal

³APDP-ERC Portuguese Diabetes Association Education and Research Center, Rua do Salitre, No. 118-120, 1250-203 Lisbon, Portugal

Correspondence should be addressed to M. Paula Macedo; paula.macedo@fcm.unl.pt

Received 7 November 2014; Accepted 5 March 2015

Academic Editor: Maria Carmen Collado

Copyright © 2015 Nádia Duarte et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is rapidly becoming the most prevalent cause of liver disease worldwide and afflicts adults and children as currently associated with obesity and insulin resistance. Even though lately some advances have been made to elucidate the mechanism and causes of the disease much remains unknown about NAFLD. The aim of this paper is to discuss the present knowledge regarding the pathogenesis of the disease aiming at the initial steps of NAFLD development, when inflammation impinges on fat liver deposition. At this stage, the Kupffer cells attain a prominent role. This knowledge becomes subsequently relevant for the development of future diagnostic, prevention, and therapeutic options for the management of NAFLD.

ANEXO 2

Apresentação de Poster

Indução de NAFLD em modelo murino por dieta suplementada com glucose e frutose

Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Diabetologia

Tomar, Portugal

2015

Indução de NAFLD em modelo murino por dieta suplementada com Glucose e Frutose

Joana I. Almeida¹, Nádia Duarte^{1,2}, Inês C. Coelho¹, Rogério Ribeiro³, Tânia G. Carvalho⁴, M. Paula Macedo^{2,3}, Carlos Penha-Gonçalves¹

¹ Instituto Gulbenkian de Ciência, ² Centro de Estudos de Doenças Crónicas (CEDOC), ³ Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa, ⁴ IAPDP Diabetes Portugal Education and Research Center (IAPDP-ERC), ⁵ Instituto de Medicina Molecular



INTRODUÇÃO

Indivíduos com diabetes e pré-diabetes caracterizada por intolerância à glucose desenvolvem com maior prevalência de doença do fígado gordo não alcoólico (do inglês, Non-alcoholic fatty liver disease, (NAFLD)). A resistência à insulina está frequentemente associada a esta condição que embora benigna em estádios iniciais leva a um aumento significativo do risco de desenvolvimento de formas mais severas de disfunção hepática (cirrose e carcinoma hepatocelular).

O aumento da incidência de NAFLD está associado a obesidade, dislipidémia, hipertensão arterial e diabetes tipo 2, reflectindo o impacto de consumo de dietas hipercalóricas e da adopção de estilos de vida sedentários na população.

Evidências recentes descrevem a frutose como molécula indutora de estados pro-inflamatórios e pro-oxidantes. A frutose é frequentemente ingerida em conjugação com glucose em refrigerantes e é preferencialmente metabolizada pelo fígado. Em condições de excessivo aporte de glicídios a frutose é preferencialmente direccionada para a via de *de novo* lipogénese.

OBJECTIVO

Neste estudo caracterizámos um modelo murino de NAFLD induzido por exposição a água enriquecida com frutose ou com a combinação glucose-frutose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Murganços fêmeas da estirpe C57BL/6 foram submetidos ou não a dieta com 60% frutose ou 12% glucose+30% frutose na água, durante 6 ou 17 semanas. Como indicadores de alterações metabólicas foram avaliados: o aumento de peso corporal; o controlo glicémico em resposta a uma prova de tolerância oral de glucose (OGTT); o desenvolvimento de esteatose, inflamação e fibrose hepática e os níveis de triglicéridos no soro. O volume de água e comida ingeridos pelos murganços ao longo da dieta foram registados.

RESULTADOS

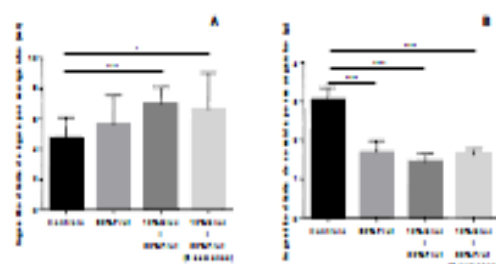


Figura 1: Murganços expostos à dieta suplementada com glucose e frutose durante 6 e 17 semanas ingeriram diariamente mais água e menos comida que o grupo não exposto a dieta. Medição semanal do volume de água ingerido por murganço (A) e da quantidade de comida (B). 1940; ***P<0.001 e **P<0.01.

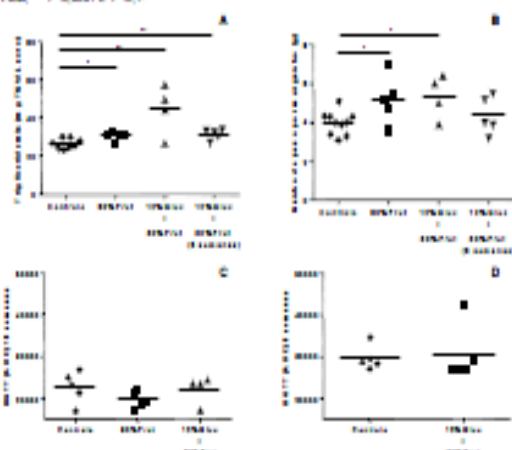


Figura 2: Murganços submetidos a dieta enriquecida com frutose ou a dieta combinada de glucose-frutose, durante 6 e 17 semanas, apresentaram significativamente superior aos controlos. 17 semanas de exposição a qualquer das dietas levou a um aumento significativo do peso corporal. Não foram observadas alterações na metabolização da glucose durante a OGTT em nenhum dos grupos. Quantificação de triglicéridos no soro através do método colorimétrico (2.1) no fim do tempo de exposição à dieta (A). Medição e cálculo da diferença entre o peso final e inicial murganços (B). Avaliação do controlo glicémico face a um estímulo de glucose (1.5g glucose/kg peso corporal) - OGTT às 6 e 17 semanas de dieta. Áreas de glucose no tempo, 0, 15, 30, 60 e 120 minutos (C e D). 1940; ***P<0.001, **P<0.01 e *P<0.05.

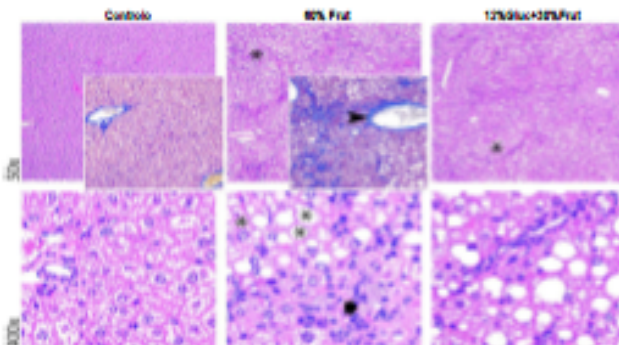


Figura 3: Murganços expostos a dietas suplementadas com frutose apresentaram perturbações hepatocelulares visíveis (vacuolização, lipídios e fibrose), mas sem infiltração celular inflamatória. Análise histológica de leito hepático por coloração com H&E e Cíntese de 4 a 5 secções transversais, 3 µm de espessura, de fígado perfurado de murganços controlo e submetidos a dietas de 60%Frutose ou 12%Glucose+30%Frutose na água durante 17 semanas. Imagens obtidas com objectivos de 50x e de 400x. Símbolos: * vacuolização celular; > fibrose; + acumulação de lipídios.

Tabela 1: Avaliação histológica de leito hepático em NAFLD. Esteatose hepática: 0: <5%; 1: 5-33%; 2: 34-66%; 3: >66%. Infiltração celular: 0: nenhuma; 1: ligeira; 2: moderadamente; infiltração celular: 0: nenhuma; 1: <2 focos/100x; 2: 2-4 focos/100x; 3: 4-6 focos/100x; Fibrose: 0: nenhuma; 1: periporaleste; 2: periporaleste; 3: bridging (adaptado de Kleiner DE, Brunt EM) (ver lista de referências). Controlo: 0: 0/100; 1: 0/100; 2: 0/100; 3: 0/100.

Dieta	Esteatose hepática (0-3)	Infiltração celular (0-3)	Infiltração celular (0-3)	Score de atividade de NAFLD (0-8)	Fibrose (0-3)
Controlo (n=10)	0	0	0.6	0.6	0
60% Frut (n=10)	2.2	0.2	0.6	3.2	1.4
12% Gluc+30% Frut (n=10)	2.25	0.25	0.75	3.25	1
12% Gluc+30% Frut (6 semanas) (n=10)	1	0	0.6	1.6	0

CONCLUSÃO

A exposição prolongada a uma dieta enriquecida em glucose e frutose potencia o desenvolvimento de NAFLD em murganços com sinais precoces de desenvolvimento de fibrose hepática embora não se tenha observado alterações muito marcadas na metabolização da glucose durante a OGTT.

Financiada pela projecto ERCC-CA-2004-000001.

ANEXO 3

Apresentação de Poster

Modelo experimental de NAFLD induzido por frutose

11º Congresso Português da Diabetes
Vilamoura, Portugal.

2014

MODELO EXPERIMENTAL DE NAFLD INDUZIDO POR FRUTOSE

Joana I. Almeida¹, Nádia Duarte¹, Inês C. Coelho², Rogério Ribeiro³, Carlos Penha-Gonçalves¹, M. Paula Macedo^{2,3}

¹Instituto Gulbenkian de Ciência, ²Centro de Estudo de Doenças Crónicas (CEDOC), Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa;

³APDP-Diabetes Portugal Education and Research Center (APDP-ERC)



INTRODUÇÃO

A esteatose hepática não alcoólica (NAFLD) afecta actualmente cerca de 20-30% da população em geral e 69.5% dos indivíduos diabéticos. A maioria dos pacientes com NAFLD permanecem assintomáticos, contudo em 20% dos casos ocorre inflamação hepática crónica (esteatohepatite não-alcoólica), que por sua vez pode conduzir a cirrose e cancro hepatocelular. Estudos recentes demonstram que a NAFLD em indivíduos diabéticos está fortemente associada a pior controlo glicémico e a co-morbilidades assim como a uma duplicação da mortalidade. A susceptibilidade genética a NAFLD associada à presença de DT2 não controlada, hábitos de vida sedentários e alterações dos padrões alimentares contribuem para a etiopatogenia da NAFLD. Muitos estudos descrevem a frutose como molécula potenciadora de NAFLD por promover estados pro-inflamatórios e pro-oxidantes despoletando a de novo lipogénese hepática. As células de Kupffer desempenham um papel importante na resposta inflamatória subjacente à esteatose hepática e a sua deleção é suficiente para prevenir a acumulação hepática de triglicéridos bem como a resistência hepática à insulina num modelo experimental de NAFLD.

OBJECTIVO

Desenvolver um modelo murganho de NAFLD para identificar os mecanismos de activação das células de Kupffer que contribuem para o desenvolvimento de NAFLD.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para estabelecer um modelo experimental de NAFLD induzido por frutose, comparámos murganhos fêmeas e machos da estirpe C57BL/6 que foram submetidos ou não a dieta com 30% frutose na água, durante 12 semanas. Como indicadores de alterações metabólicas avaliámos: a variação de peso dos murganhos; o controlo glicémico em resposta a um estímulo oral de glucose (OGTT); a esteatose hepática a nível celular (histologia) e os níveis de triglicéridos no fígado e soro.

RESULTADOS

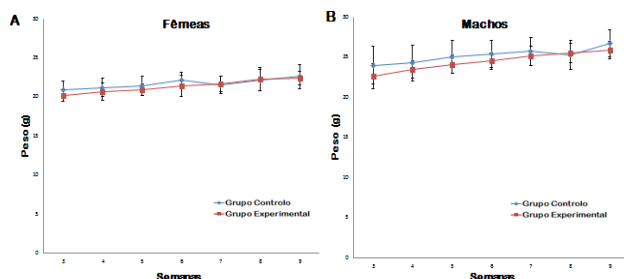


Figura 1: A exposição de murganhos, fêmeas e machos, à dieta de 30% de frutose não está associada a um aumento de peso comparativamente aos grupos controlo. Medição semanal de peso de murganhos fêmeas (A) e machos (B) durante a 3ª e 9ª semanas de exposição ou não à dieta de 30% de frutose.

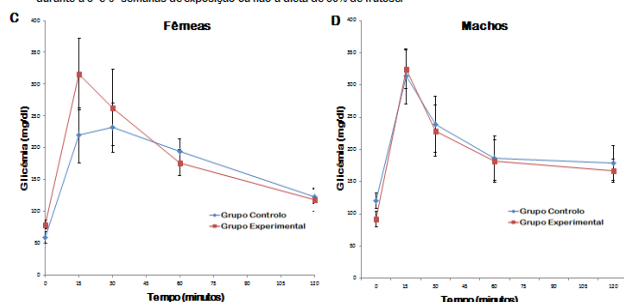


Figura 2: Não há intolerância à glucose nos murganhos fêmeas e machos após 12 semanas de exposição à dieta de 30% de frutose. Avaliação do controlo glicémico face a um estímulo de glucose (1,5g glucose/kg peso corporal) - prova de tolerância oral à glucose - em fêmeas (C) e machos (D). Valores de glicemia obtidos nos tempos, 0, 15, 30, 60 e 120 minutos.

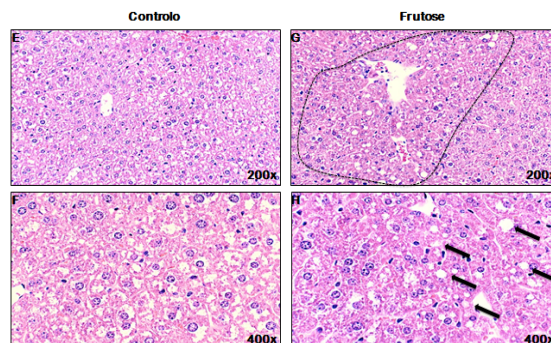


Figura 3: Murganhos fêmeas sujeitos à dieta de 30% de frutose apresentam perturbações hepatocelulares visíveis (acumulação de triglicéridos), mas sem infiltração celular. Histologia de fígado de fêmeas de grupo controlo (E e F) e de fêmeas expostas à dieta de 30% de frutose (G e H). Coloração com Hematoxilina e Eosina de 4 a 5 secções transversais, 3 µm de espessura, de fígado parafrinado de murganhos fêmeas controlo e experimental. Imagens obtidas com objectivas de 200x (E e G) e de 400x (F e H).

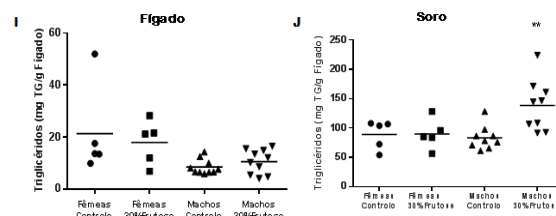


Figura 4: A exposição à dieta energética de 30% de frutose, durante 12 semanas, não é suficiente para a acumulação de triglicéridos no fígado em fêmeas e machos. Contudo, no soro de machos sujeitos à dieta há circulação de triglicéridos comparativamente ao controlo e às fêmeas. A quantificação de triglicéridos no fígado (I) e soro (J) em fêmeas e machos, grupos controlo e experimental, através do método clorofórmio:metanol (2:1), na 12ª semana de exposição à dieta. Os resultados pela média, **p<0,01.

CONCLUSÃO

A dieta com 30% de frutose na água de bebida induz alterações ligeiras do metabolismo lipídico. Com vista a obter um fenótipo de NAFLD mais evidente serão utilizadas estratégias de introdução de combinações frutose/glucose mais comparáveis à dieta humana.

Financiado pelo projecto PTDC/BIM-MET/0486/2012

